



**Rita Fabiana Silva  
Simões**

**Potencialidades da Espectroscopia de infravermelho  
com Transformadas de Fourier na caracterização de  
aguardentes vínicas.**

dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica e Química dos Alimentos, realizada sob a orientação científica do Doutora Ivonne Delgadillo Giraldo, Professora Associada com Agregação do Departamento de Química da Universidade de Aveiro, Doutor António de Sousa Barros, Investigador Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro e Doutora Ilda Caldeira, Investigadora do Departamento de Enologia da ex-Estação Vitivinícola Nacional - Instituto Nacional de Recursos Biológicos, em Dois-Portos.

Este trabalho foi realizado na ex-Estação Vitivinícola  
Nacional-Instituto Nacional de Recursos Biológicos em Dois Portos.

À memória dos meus avós Deolinda da Silva Mendes e António de Sousa da Silva.

***“O que é bonito neste mundo, e anima,  
É ver que na vindima  
De cada sonho  
Fica a cepa a sonhar outra aventura...”  
(Miguel Torga)***

**o júri**  
Presidente

**Prof. Dr. Manuel António Coimbra Rodrigues da Silva**  
Professor associado com agregação do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

**Prof. Dr. Osmaro Santos Silva Rangel**  
Professor associado da Escola Superior de Biotecnologia, da Universidade Católica Portuguesa

**Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ivonne Delgadillo Giraldo (orientadora)**  
Professora associada com agregação do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

**Doutor António de Sousa Barros**  
Investigador da Universidade de Aveiro (co-orientador)

**Doutora Ilda Caldeira**  
Investigadora do Departamento de Enologia da Ex- Estação Vitivinícola Nacional-Instituto de Recursos Biológicos, em Dois-Portos (co-orientadora externa)

## **agradecimentos**

Para que a realização deste trabalho fosse possível muitas pessoas me ajudaram, tanto a nível familiar como profissional, e por isso gostaria de expressar o meu profundo, sincero e grato agradecimento.

Gostaria de começar pelos meus pais, pois sem eles nada teria sido possível, agradeço-lhes toda a confiança que demonstram ter em mim. E com muito carinho sou lhes grata por tudo o seu apoio.

Ao Cristiano agradeço por me ter inscrito neste Mestrado, por sempre me incentivar e encorajar duante esta fase da minha vida.

À Doutora Ilda Caldeira agradeço pela sua orientação durante o trabalho, pela sua amizade, disponibilidade e sensibilidade com que acompanhou alguns problemas que surgiram no decurso deste trabalho.

À Professora Doutora Ivonne Delgadillo Giraldo agradeço pela orientação durante o trabalho, pelo seu apoio, compreensão e amizade ao longo deste período.

Ao Doutor António de Sousa Barros agradeço pela sua orientação e disponibilidade para a realização da análise multivariada de dados.

Gostaria ainda de agradecer à Amélia e a Dona Deolinda que todos os dias me deram animo e apoio para não desistir.

A todos o meu bem haja. Muito Obrigada !!!!!

## palavras-chave

Aguardente vínica, caracterização, espectroscopia de infravermelho, FITR, análise multivariada, calibração, PLS.

## resumo

As aguardentes vínicas encontram-se bem divulgadas no mercado nacional e estrangeiro, apresentando um valor económico importante. Este produto ostenta características peculiares, cujo valor varia mediante a casta, o clima, o sistema de produção e período de envelhecimento.

A espectroscopia de infravermelho com transformadas de Fourier tem sido aplicada frequentemente como um método analítico, que fornece resultados rápidos e satisfatórios no estudo de autenticação e controlo de qualidade de produtos alimentares e de bebidas alcoólicas, possibilitando a realização de análises não destrutivas, a obtenção de um grande conjunto de dados e a aplicação de técnicas quimiométricas. A quimiometria consiste na utilização de métodos multivariados para a construção de modelos de calibração e previsão, com o intuito de determinar uma propriedades de substâncias.

A região do infravermelho próximo consiste na faixa espectral onde as ligações C-H, O-H e C=O possuem bandas de absorção características., que muitas vezes surgem sobrepostas, sendo necessário aplicar métodos de calibração multivariada. Neste sentido a partir dos espectros registados na região do infravermelho médio de amostras de aguardentes vínica, foram construídos modelos de calibração para os parâmetros físico-químicos: TAV, AcTotal, AcVol, AcFixa, ESeco, A440 e IFC, tendo como principal foco deste trabalho o uso da Regressão Parcial em Mínimos Quadrados (PLS1, do inglês "*Partial Least Squares*").

Pretende-se com a realização deste trabalho estudar a possibilidade da conjugação da Espectroscopia de infravermelho com transformadas de Fourier com a análise multivariada foi usada a região  $3926-926\text{ cm}^{-1}$ , tendo sido aplicada a Análise de Componentes Principais (PCA) e a Regressão Parcial em Mínimos Quadrados (PLS1) para a caracterização de amostras de aguardentes vínicas envelhecidas.

A realização do trabalho permitiu estudar de forma comparativa dois modelos de calibração multivariada: o modelo proposto pelo software do sistema WineScan FT120 e o modelo de calibração proposto pelo software desenvolvido na Universidade de Aveiro.

**keywords**

Brandy, characterization, infrared spectroscopy, FITR, multivaried analysis, calibration, PLS.

**abstract**

The brandies are well known at the national and foreign market, presenting an important economic value. These products show peculiar characteristics, and their value varies according to the breed, the climate, the production system and the aging period.

The infrared spectroscopy with Fourier's modified has frequently been applied as an analytical method, which supplies fast and satisfactory results in the authentication and quality control study of food and of alcoholic drinks, making it possible to accomplish non-destructive analyses, to obtain a great group of data and the application of chemometric techniques. The chemometry consists of using multi-varied methods for the construction of calibration and forecast models, with the intention of determining the properties of substances.

The area of close infrared corresponds to the spectral strip where the connections C-H, O-H and C=O possess characteristic absorption bands, that many times appear overlapped, which makes it necessary to apply methods of multi-varied calibration. In this sense, starting from the registered spectra, in the area of the medium infrared, of samples of brandies, calibration models were built for the physiochemical parameters: "TAV", "AcTotal", "AcVol", "AcFixa", "ESeco", "A440" and "IFC", having as main focus of this work the use of the Partial Regression in Least Squares (PLS1, from the English "Partial Least Squares").

With the accomplishment of this work one intends to study the possibility of the conjugation of infrared Spectroscopy with Fourier's modified, with the multi-varied analysis. Thus, the area  $3926-926\text{ cm}^{-1}$  was used and the Analysis of Main Components (PCA) and the Partial Regression in Least Squares (PLS1) were applied for the characterization of samples of aged brandies.

The accomplishment of the work allowed the comparative study of two models of multi-varied calibration: the model proposed by the software of the WineScan FT120 system and the calibration model proposed by the software developed at the University of Aveiro.

## ÍNDICE GERAL

|       |   |    |
|-------|---|----|
| 1     | Introdução  | 1  |
| 1.1   | O processo de obtenção da aguardente vínica envelhecida ou brandy               | 3  |
|       | <i>A matéria-prima</i>  | 3  |
|       | <i>A destilação</i>   | 3  |
|       | <i>O envelhecimento</i>   | 4  |
| 1.2   | Composição química da aguardente vínica envelhecida                             | 8  |
| 1.2.1 | Compostos de baixa massa molecular  | 8  |
| 1.2.2 | Compostos de elevada massa molecular  | 19 |
| 1.2.3 | Controlo de qualidade da aguardente vínica envelhecida                          | 20 |
| 1.3   | Espectroscopia de infravermelho - <i>Princípios básicos</i>                     | 21 |
| 1.3.1 | Infravermelho próximo (NIR) e médio (MIR)                                       | 24 |
| 1.3.2 | Espectroscopia de infravermelho com transformadas de Fourier (FT-IR)            | 25 |
| 1.3.3 | Aplicação da espectroscopia de infravermelho no controlo de qualidade alimentar | 27 |
| 1.4   | Quimiometria  | 31 |
| 1.4.1 | Alguns conceitos de estatística   | 31 |
| 1.4.2 | Regressão linear simples  | 32 |
| 1.4.3 | Princípios básicos sobre a calibração multivariada                              | 34 |
| 1.4.4 | Análise em componentes principais (PCA)   | 36 |
| 1.4.5 | Regressão parcial por mínimos quadrados (PLS)                                   | 37 |
| 1.4.6 | Validação do modelo de calibração   | 38 |
| 1.4.7 | Seleccção do número de variáveis latentes                                       | 39 |
| 2     | Objectivos  | 41 |



|         |   |    |
|---------|---|----|
| 3       | Materiais e Métodos   | 42 |
| 3.1     | Métodos analíticos comuns   | 42 |
| 3.1.1   | Título alcoométrico volúmico  | 42 |
| 3.1.2   | Acidez total, acidez fixa, acidez volátil   | 42 |
| 3.1.3   | Extrato seco  | 42 |
| 3.1.4   | Intensidade da cor  | 42 |
| 3.1.5   | Polifenóis totais   | 43 |
| 3.2     | Obtenção dos espectros de infravermelho das aguardentes vínicas envelhecidas                                      | 43 |
| 3.2.1   | Equipamento WineScan FT120  | 43 |
| 3.3     | Construção dos modelos de calibração multivariada   | 44 |
| 3.3.1   | Delineamento experimental e amostragens   | 45 |
| 3.3.2   | Aquisição dos espectros   | 48 |
| 3.3.3   | Análise multivariada  | 48 |
| 3.3.3.1 | Calibração  | 48 |
|         | <i>Software desenvolvido na Universidade de Aveiro</i>  | 48 |
|         | <i>Software WineScan FT120 v.2.2.2</i>  | 49 |
| 4       | Resultados e Discussão  | 50 |
| 4.1     | Análise em Componentes Principais dos espectros das aguardentes vínicas envelhecidas.                             | 51 |
| 4.2     | Modelos PLS1 para os parâmetros físico-químicos: TAV, AcTotal, AcVol; AcFixa; ESeco; A440 e IFC                   | 53 |
|         | <i>Software desenvolvido na Universidade de Aveiro</i>  | 53 |
|         | <i>Software WineScan FT120 v.2.2.2</i>  | 55 |
| 4.3     | Interpretação dos modelos PLS1 para os parâmetros físico-químicos: TAV, AcTotal, AcVol; AcFixa; ESeco; A440 e IFC | 57 |
|         | <i>Título alcoométrico volúmico</i>   | 57 |

|                                    |        |
|------------------------------------|--------|
| <i>Acidez total</i>                | 60     |
| <i>Acidez fixa</i>                 | 63     |
| <i>Acidez volátil</i>              | 66     |
| <i>intensidade da cor a 440 nm</i> | 69     |
| <i>Extracto seco</i>               | 73     |
| <i>Índice de Folin-Ciocalteau</i>  | 76     |
| <br>5 Conclusão                    | <br>82 |
| Bibliografia                       | 85     |
| Anexos                             | 106    |

## LISTA DE ABREVIATURAS

|         |  |
|---------|--|
| A280    | absorvância a 280 nm   |
| A440    | absorvância a 440 nm   |
| AcFixa  | acidez fixa  |
| AcVol   | acidez volátil   |
| AcTotal | acidez total   |
| ATR     | reflectância total atenuada ( <i>Attenuated Total Reflectance</i> )                        |
| BPPV    | boas práticas de produção vitivinícola   |
| CAST    | castanheiro português ( <i>Castanea sativa</i> Mill.)                                      |
| CFA     | carvalho francês da floresta de Allier ( <i>Quercus sessiflora</i> Salisb.)                |
| CFL     | carvalho francês da floresta de Limousin ( <i>Quercus robur</i> L.)                        |
| CNE     | carvalho português ( <i>Quercus pyrenaica</i> Willd.) da zona geográfica-E                 |
| CNF     | carvalho português ( <i>Quercus pyrenaica</i> Willd.) da zona geográfica-F                 |
| CNG     | carvalho português ( <i>Quercus pyrenaica</i> Willd.) da zona geográfica-G                 |
| DOC     | denominação de origem controlada   |
| GC-DIC  | cromatografia gasosa com detector de ionização de chama                                    |
| GC-MS   | cromatografia gasosa com detecção por espectrometria de massa                              |
| GCL     | cromatografia gás-líquido  |
| HPLC    | cromatografia líquida de alta resolução  |
| HPLC-MS | cromatografia gás-líquido de alta resolução com detecção por espectrometria de massa       |
| GC-O    | cromatografia gasosa-olfactometria   |
| DA      | análise discriminante  |
| DRIFTS  | espectroscopia por reflectância difusa no infravermelho médio com transformadas de Fourier |
| EC      | carbanato de etilo   |
| ExtSeco | extracto seco  |
| FTIR    | espectroscopia de infravermelho com transformadas de Fourier                               |

|          |  |
|----------|--|
| FT-NIR   | espectroscopia de infravermelho próximo com transformadas de Fourier |
| FT-PAS   | espectroscopia de infravermelho-fotoacústica                         |
| FT-Ramam | espectroscopia Ramam com transformadas de Fourier                    |
| IC       | cromatografia iónica   |
| IFC      | índice de Folin-Ciocalteu  |
| Ipt      | índice de polifenóis totais  |
| LOOCV    | leave-one-out cross validation                                       |
| LKOCV    | leave-k-out cross validation   |
| MBPPV    | manual de boas práticas de produção vitivinícola                     |
| MIR      | infravermelho médio  |
| MLR      | regressão linear múltipla  |
| MSEPcv   | erro médio de previsão   |
| NIR      | infravermelho próximo  |
| PC       | componente principal   |
| PCA      | análise em componentes principais                                    |
| PCR      | regressão em componentes principais                                  |
| PLS      | regressão parcial em mínimos quadrados parciais                      |
| PRESS    | somatório do quadrado dos erros de previsão                          |
| RMSECV   | raiz quadrada do erro médio de previsão                              |
| SI       | índice de semelhança   |

## ÍNDICE DE TABELAS

|   |     |
|---|-----|
| Tabela 3.1-Aguardente utilizadas no trabalho experimental.  | 46  |
| Tabela 4.1-Resumo dos resultados obtidos para os modelo PLS1 (Software desenvolvida na Universidade de Aveiro).   | 55  |
| Tabela 4.2-Resumo dos resultados obtidos para os modelos PLS1 (Software do equipamento Winescan FT120 v.2.2.2.).  | 56  |
| Tabela 4.3-Resumo da informação química espectral   | 79  |
| Quadro 1-A-Regulamentação Vitivinícola para Aguardentes (Adaptado de <a href="http://www.ivv.min-agricultura.pt">www.ivv.min-agricultura.pt</a> ).                    | 105 |
| Quadro 2-A-Limites analíticos e limites de emprego de bebidas espirituosas (Adaptado de <a href="http://www.ivv.min-agricultura.pt">www.ivv.min-agricultura.pt</a> ). | 108 |

## ÍNDICE DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| Figura 1.1-Fotografia da destilaria da ex-Estação Vitivinícola Nacional-Instituto Nacional de Recursos Biológicos, em Dois-Portos.   | 4  |
| Figura 1.2-Fotografia da cave ex-Estação Vitivinícola Nacional-Instituto Nacional de Recursos Biológicos, em Dois-Portos.  | 5  |
| Figura 1.3-Mecanismo de degradação da lenhina e compostos derivados propostos por Puech <i>et al.</i> (1990).  | 14 |
| Figura 1.4-Modos de vibração molecular-Alongamento (Skoog <i>et al.</i> , 2002).   | 23 |
| Figura 1.5-Modos de vibração molecular-Deformação (Skoog <i>et al.</i> , 2002).  | 24 |
| Figura 1.6-Absorções registadas no IV (Ramos, 2006).   | 25 |
| Figura 1.7-Eschema simplificado do interferómetro de Michelson e do princípio de operação do espectrofotómetro FT-IR (Espectroscopia de infravermelho com transformadas de Fourier) (Manual – WineScan FT120, Foss, 2000). | 26 |
| Figura 1.8-Gráfico de pares ( $x_i$ ; $y_i$ ).   | 32 |
| Figura 1.9-Modelo geral do processo de calibração multivariada (Ferreira <i>et al.</i> , 1999).  | 34 |
| Figura 1.10-Matriz X utilizada na elaboração do modelo de calibração (linha x coluna).   | 35 |
| Figura 1.11-Matriz Y utilizada na construção do modelo de calibração (linha x coluna).   | 35 |
| Figura 3.1-Fotografia do espectrofotómetro Ultravioleta/Visível.   | 43 |
| Figura 3.2-Fotografia do aparelho - Winescan FT120.  | 44 |
| Figura 4.1-Espectros de quatro amostras de aguardentes vónicas envelhecidas obtidos no Winescan FT120.   | 51 |
| Figura 4.2-Coordenadas Factoriais (PC1 vs. PC2) dos espectros FT-IR das aguardentes vónicas.   | 52 |
| Figura 4.3-Contribuições factoriais (PC1 e PC2) dos espectros FT-IR das aguardentes vónicas.   | 53 |
| Figura 4.4-Relação entre o valor estimado e actual para o TAV, obtido pelo software desenvolvido na Universidade de Aveiro.  | 57 |

|  |    |
|--|----|
| Figura 4.5-Relação entre o valor estimado e actual para o TAV, obtido pelo software WineScan FT120 v.2.2.2.                      | 57 |
| Figura 4.6-Coefficiente B para a quantificação do TAV.   | 58 |
| Figura 4.7-Relação entre o valor estimado e actual para o AcTotal, obtido pelo software desenvolvido na Universidade de Aveiro.  | 60 |
| Figura 4.8-Relação entre o valor estimado e actual para o AcTotal, obtido pelo software WineScan FT120 v.2.2.2.                  | 60 |
| Figura 4.9-Coefficiente B para a quantificação do AcTotal.   | 61 |
| Figura 4.10-Relação entre o valor estimado e actual para o AcFixa, obtido pelo software desenvolvido na Universidade de Aveiro.  | 63 |
| Figura 4.11-Coefficiente B para a quantificação do AcFixa.   | 64 |
| Figura 4.12-Relação entre o valor estimado e actual para o AcVol, obtido pelo software desenvolvido na Universidade de Aveiro.   | 66 |
| Figura 4.13-Coefficiente B para a quantificação do AcVol.  | 66 |
| Figura 4.14-Relação entre o valor estimado e actual para o A440 nm, obtido pelo software desenvolvido na Universidade de Aveiro. | 69 |
| Figura 4.15-Relação entre o valor estimado e actual para o A440 nm, obtido pelo softwaredo aparelho WineScan FT120 v.2.2.2.      | 69 |
| Figura 4.16-Coefficiente B para a quantificação do A440 nm.  | 70 |
| Figura 4.17-Relação entre o valor estimado e actual para o ESeco, obtido pelo software desenvolvido na Universidade de Aveiro.   | 73 |
| Figura 4.18-Relação entre o valor estimado e actual para o ESeco, obtido pelo software WineScan FT120 v.2.2.2.                   | 73 |
| Figura 4.19-Coefficiente B para a quantificação do ESeco.  | 73 |
| Figura 4.20-Relação entre o valor estimado e actual para o IFC, obtido pelo software desenvolvido na Universidade de Aveiro.     | 76 |
| Figura 4.21-Relação entre o valor estimado e actual para o IFC, obtido pelo software WineScan FT120 v.2.2.2.                     | 76 |





## 1. Introdução

A aguardente vínica é o produto resultante da destilação do vinho e/ou de destilados do vinho (Decreto-Lei n.º 390/86; Regulamento CE n.º 110/2008). Após a sua obtenção a aguardente é colocada em vasilhas de madeira onde decorre o seu envelhecimento por um período mínimo de seis meses (Regulamento CE n.º 110/2008) e passa a ser designada por aguardente vínica velha (Decreto-Lei n.º 390/86) ou brandy (Regulamento CE n.º 110/2008).

Assim, e de acordo com o referido Regulamento a definição de brandy é a seguinte; bebida espirituosa:

- obtida a partir de aguardentes de vinho, lotadas ou não com um destilado de vinho, destilado a menos de 94,8 % v/v, desde que o referido destilado não ultrapasse o limite máximo de 50,0 % v/v em grau alcoólico do produto acabado;
- envelhecida em recipientes de madeira de carvalho durante pelo menos um ano ou, no caso da utilização de tonéis de carvalho com capacidade inferior a 1 000 litros, durante um mínimo de seis meses.

A nível mundial existem apenas quatro regiões com o Estatuto de Região Demarcada com Denominação de Origem Controlada (DOC) para a produção de aguardente vínica envelhecida de qualidade, são elas:

- Armagnac, demarcada por Decreto-Lei do governo francês em Maio de 1909, que lhe atribuiu a designação de “*Appellation Contrôlée Armagnac*”. O Armagnac é produzido nas regiões de Gers, Landes e Lot-et-Garonne, em França.
- Cognac, demarcada por Decreto-Lei do governo francês em Maio de 1909, tendo-lhe sido atribuída a designação de “*Appellation Contrôlée de Cognac*”. O Cognac é produzido na região de Charante, em França.
- Pisco, demarcada por Decreto-Lei do governo peruano em 1990. A aguardente vínica, denominada por Pisco é elaborada na costa dos estados de Lima, Ica, Arequipa, Moquegua e nos vales de Locumba, Sama e Caplina do Departamento (Estado) de Tacna (região Sul do Peru). Esta bebida espirituosa é produzida, também na região Norte do Chile (Bordeu *et al.*, 2004).

- Lourinhã, foi criada em Março de 1992, através do Decreto-Lei n.º 34/92, pelo governo português. A aguardente vínica da Lourinhã é produzida nos municípios da Lourinhã, Peniche, Óbidos, Bombaral e Torres Vedras.

A produção de uma aguardente vínica envelhecida de qualidade requer tempo, experiência e sabedoria. Na fase inicial a selecção das uvas deve ser cuidadosa, donde resultará um vinho leve e equilibrado na acidez e graduação alcoólica. Os vinhos são posteriormente submetidos a lentas e cuidadas destilações. O envelhecimento em vasilha de madeira constitui uma etapa fundamental para a sua produção, sendo que as características físico-químicas e organolépticas que a aguardente vínica adquire ao longo do tempo, resultam da acção conjunta de vários factores, nomeadamente; as características do destilado, as propriedades da vasilha de madeira (espécie botânica, origem geográfica, idade da madeira e processo de fabrico) e condições de envelhecimento (duração do período de envelhecimento e características da cave).

A aguardente vínica envelhecida, tal como outros produtos alimentares, deve ser submetida ao controlo de qualidade, procedendo-se para o efeito à sua avaliação sensorial e físico-química. No que respeita à análise físico-química, para além dos parâmetros para os quais existem limitações legais, como o título alcoométrico volúmico e alguns compostos voláteis (Regulamento CE n.º 110/2008), existem outros parâmetros que são habitualmente avaliados nas aguardentes, designadamente: o extracto seco total, a acidez total, a acidez fixa, a acidez volátil, o índice de polifenóis totais e a intensidade da cor, que constituem indicadores importantes do processo e das condições de envelhecimento da aguardente (Belchior *et al.*, 1998; Belchior *et al.*, 2001). Estas determinações são realizadas de acordo com os métodos oficiais (Belchior e Carvalho, 1984; Regulamento n.º 2870/2000, NP 3263/1990) os quais são relativamente morosos.

Assim, as técnicas espectroscópicas, com resultados interessantes no estudo e autenticação de produtos alimentares e de bebidas alcoólicas (Baeten *et al.*, 2000; Rodriguez-Sanoa *et al.*, 2001; Duarte *et al.*, 2002; Moreira *et al.*, 2002; Palma *et al.*, 2002; Ferrão *et al.*, 2004; Saiz-Abajo *et al.*, 2004a; Saiz-Abajo *et al.*, 2004b; Cozzolino *et al.*, 2005; Morreira *et al.*, 2005; Helfer *et al.*, 2006; Picque *et al.*, 2006; Pontes *et al.*, 2006; Rodriguez-Sanoa *et al.*, 2006; Morgado *et al.*, 2007) apareceram nos últimos anos como alternativas interessantes para o controlo de qualidade de produtos alimentares, dado serem técnicas de análise rápida e que não necessitam de grande preparação da amostra.

Neste contexto, destaca-se o uso da espectroscopia de infravermelho com Transformadas de Fourier (FT-IR) e a sua utilização na caracterização e autenticação de bebidas alcoólicas como vinhos, runs, brandies, coganes, vodkas, licores, tequilas, uísques e cervejas (Schindler *et al.*, 1998; Palma *et al.*, 2002; Coelho *et al.*, 2003; Duarte *et al.*, 2004; Nieuwoudt *et al.*, 2004; Moreira *et al.*, 2004; Paty *et al.*, 2004; Cocciardi *et al.*, 2005; Lachenmeier, 2005; Lachenmeier *et al.*, 2005; Moreira *et al.*, 2005; Bevin *et al.*, 2006; Harrison *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2006; Nagarajan *et al.*, 2006; Pontes *et al.*, 2006; Yu *et al.*, 2006; Lachenmeier, 2007).

## **1.1 O processo de obtenção da aguardente vínica envelhecida ou brandy**

### ***A matéria-prima***

As uvas destinadas à elaboração do vinho para a produção de aguardente vínica envelhecida não devem ser ricas em açúcares, devendo no entanto ter um teor elevado em ácidos. A vinificação das uvas, é geralmente reduzida às operações elementares. No entanto, são necessárias precauções para a produção de aguardentes vínicas de qualidade.

O vinho com qualidades para a destilação deve apresentar, um aroma fino e um sabor sem defeitos, uma acidez fixa elevada (superior a 4 g/l de ácido tartárico) que o pode tornar desagradável na prova, devendo apresentar um título alcoométrico volúmico, máximo de 10,0% v/v, ter um pH baixo, ser pobre em taninos, ser vinificado sem a utilização de dióxido de enxofre (Lafon *et al.*, 1973). A protecção, sob o ponto de vista microbiológico, do vinho, até ao momento da destilação, é assegurada pela elevada acidez fixa, que diminui o risco de contaminação microbiana e permite evitar o uso de dióxido de enxofre ao longo da vinificação (Lafon *et al.*, 1973), dado que a sua utilização iria originar, durante a destilação o aparecimento de mercaptanos, que conferem aromas desagradáveis à aguardente.

### ***A destilação***

A operação de destilação revela-se um factor essencial para a qualidade desta bebida espirituosa. O processo de destilação é normalmente efectuado em alambique ou coluna de

destilação, que sob a acção do calor, permite a separação e selecção dos compostos voláteis do vinho.

Os sistemas de destilação utilizados podem ser de dois tipos (figura 1.1):

- sistema contínuo (utilizado na região da Lourinhã e em Armagnac), em que existe uma coluna de destilação, normalmente de cobre, que pode ser equipada com pratos de uma só calote ou pratos de calotes múltiplas, de alimentação contínua, sem qualquer órgão de rectificação suplementar. O destilado final denominado por aguardente vínica, deve apresentar um título alcoométrico não superior a 78,0 % v/v;
- descontínuo, composto por um alambique de cobre (utilizado na região de Cognac), constituído por uma caldeira, com capacidade máxima de 30 hL e aquecida a fogo directo, por um capitel, com ou sem aquece-vinhos, e por uma serpentina (refrigerante). Numa primeira destilação é obtido um destilado com um título alcoométrico compreendido entre 27,0 % v/v e 30,0 % v/v, e na seguinte, é obtida uma fracção intermédia, designada por coração, que constitui o destilado final, o qual deverá ter título alcoométrico não superior a 72,0 % v/v. O não aproveitamento das fracções de destilação “cabeças” e “caudas” deve-se ao facto do perfil aromático indesejado das mesmas.



**Figura 1.1-Fotografia da destilaria da ex-Estação Vitivinícola Nacional-Instituto Nacional de Recursos Biológicos, em Dois-Portos.**

### ***O envelhecimento***

Após a fase de destilação a aguardente vínica, também por vezes designada por aguardente branca, caracterizada por apresentar um elevado título alcoométrico, alguma riqueza aromática e ausência de compostos fenólicos (Caldeira, 2004) é colocada em

quartolas de madeira (figura 1.2) durante um período de tempo, que varia de acordo com a regulamentação em vigor para cada Região Demarcada de Aguardente Vínica de Qualidade, com Denominação de Origem Controlada (DOC) para a sua produção. O processo de envelhecimento envolve um conjunto de fenómenos de natureza diversa (Nishimura *et al.*, 1989):

- extracção dos compostos da madeira, aliada à decomposição dos seus biopolímeros e da sua transferência para o destilado,
- reacções entre os compostos extraídos da madeira,
- reacções entre os compostos da madeira e do destilado,
- reacções entre os compostos do destilado,
- concentração de compostos não voláteis e evaporação dos compostos mais voláteis da aguardente.



**Figura 1.2–Fotografia da cave da ex-Estação Vitivinícola Nacional -Instituto Nacional de Recursos Biológicos, em Dois-Portos.**

Durante o envelhecimento ocorre um aumento significativo do extracto seco total, do índice de polifenóis totais, da intensidade da cor, bem como a evolução de outras características cromáticas e organolépticas da aguardente vínica envelhecida (Canas *et al.*, 1999; Belchior *et al.*, 2001; Canas *et al.*, 2000a; Canas *et al.*, 2000b; Caldeira *et al.*, 2002; Canas *et al.*, 2002; Caldeira *et al.*, 2006). Estudos realizados demonstram que durante o primeiro ano de envelhecimento as reacções de extracção dos compostos de baixa massa molecular, são claramente acentuadas, nomeadamente dos compostos fenólicos da madeira para o destilado (Canas *et al.*, 2002), que se traduz num aumento considerável da concentração de aldeídos fenólicos, de ácidos fenólicos, de cumarinas, de taninos e de fenóis voláteis (Canas, 2003; Canas *et al.*, 2004; Caldeira, 2004).

Tradicionalmente, após um ou dois anos de estágio em madeira nova, a aguardente vínica é transferida para quartolas de madeira já utilizadas, com o intuito de reduzir a intensidade das reacções de extracção, que podem ser responsáveis por alguns defeitos no produto, como por exemplo, o aumento excessivo da sua adstringência.

O envelhecimento das aguardentes vínicas está condicionado pela composição química e tecnologia de fabrico da vasilha de madeira, no que concerne ao teor de compostos orgânicos extraíveis (Canas, 2003; Caldeira, 2004, Belchior *et al.*, 2005).

Na tecnologia de fabrico da vasilha de madeira existem duas operações com importância significativa e com repercursões na sua qualidade e, por consequência, nas características organolépticas e físico-químicas adquiridas pela aguardente vínica que nela vai envelhecer, que são a secagem/maturação e o tratamento térmico.

O processo de secagem visa reduzir a humidade da madeira para valores compatíveis com as condições de envelhecimento na Europa (teores de humidade compreendidos entre 13% a 15%). Esta operação tem o objectivo de garantir a estabilidade das aduelas da vasilha, evitando modificações a nível do tecido lenho-celulósico, como o entumecimento ou a retracção (Chatonnet *et al.*, 1995). Esta fase é acompanhada pela ocorrência de um conjunto de fenómenos químicos e bioquímicos, que definem a maturação da madeira, (Chatonnet *et al.*, 1995; Canas e Caldeira, 2006a; Canas e Caldeira, 2006b) e condicionam as características essenciais para a sua utilização no envelhecimento de bebidas alcoólicas, dado que os parâmetros como o tempo de secagem, a origem geográfica da madeira e a posição das aduelas na pilha durante o período de secagem, influenciam o teor de humidade, a intensidade da cor, o teor de extracto seco total e a concentração de alguns compostos químicos de baixa massa molecular nas madeiras (Canas *et al.*, 2006).

O tratamento térmico é realizado recorrendo a um fogacho colocado no interior da quartola pré-formada. Este processo visa a vergadura das aduelas, cuja finalidade é conferir a forma côncava à vasilha, provocando alterações na estrutura anatómica e na composição química da madeira, conduzindo ao aparecimento de novos compostos químicos (Canas, 2003). Após a vasilha formada, é de novo colocada sobre um fogacho com o objectivo de se proceder à queima da sua superfície interna. Normalmente os tanoeiros definem três níveis de queima: queima ligeira (QL), queima média (QM) e queima forte (QF). A queima apresenta uma acção degradativa sobre as macromoléculas da madeira (celulose, hemicelulose e lenhina), influenciando assim a composição e o teor de compostos

extraíveis da madeira, susceptíveis de passarem para o destilado vínico (Sarni *et al.*, 1990; Canas, 2003; Caldeira, 2004; Caldeira *et al.*, 2006a). A degradação das hemiceluloses e da celulose tem como consequência o aparecimento de aldeídos furânicos, enquanto que a degradação da lenhina está associada ao aparecimento de vários compostos fenólicos, como os aldeídos fenólicos e ácidos fenólicos (Sarni *et al.*, 1990b; Chatonnet, 1995; Granados *et al.*, 1996; Gómez-Cordovés *et al.*, 1997; Canas *et al.*, 1998; Canas *et al.*, 2000; Canas, 2003; Caldeira *et al.*, 2006a).

Ao longo do envelhecimento, são realizadas uma série de operações tecnológicas, como o atesto, o rebolamento, o adelgaçamento, entre outras, que se revelam de extrema importância neste período.

O atesto das vasilhas é realizado com alguma periodicidade, de forma a compensar a perda de aguardente por evaporação e impregnação na madeira, e para controlar as reacções de oxidação.

O rebolamento consiste em fazer rolar as vasilhas na cave, ou proceder a agitação no seu interior. Este procedimento visa facilitar as reacções de extracção, pela homogeneização do líquido. A frequência com que ocorre depende das características da vasilha (espécie botânica e nível de queima) (Canas *et al.*, 2004).

O adelgaçamento implica a adição de água, (com baixo teor em sais minerais) para evitar turvações, com a finalidade de reduzir de modo progressivo o título alcoométrico volumico da aguardente vínica envelhecida até ao valor limite imposto pela regulamentação da Região de Denominação de Origem Controlada ou pelo mercado destinatário (normalmente entre 38,0 a 40,0 % v/v).

A lotagem de aguardentes vínicas envelhecidas, visa a mistura de pelo menos duas aguardentes de diferente idade, origem ou tecnologia de envelhecimento, tendo a finalidade de melhorar a qualidade do produto final (Belchior *et al.*, 2002).

Em suma, pode afirmar-se que, embora o período de envelhecimento seja determinante para a qualidade final da aguardente vínica envelhecida, o processo de destilação e o vinho utilizado são também elementos cruciais, para a formação do perfil sensorial desta bebida destilada, sendo essenciais para a evolução da sua qualidade.

## 1.2 Composição química da aguardente vínica envelhecida

A composição química da aguardente vínica envelhecida é muito diversificada, resultando da acção conjunta de vários factores, onde se incluem a matéria-prima, as condições e a duração do processo de envelhecimento.

A sua composição química é rica em compostos voláteis e não voláteis que se formam durante a vinificação e destilação do vinho (aldeídos, acetais, álcoois superiores, ésteres, ácidos alifáticos, furfural, ...), e ao longo do período de envelhecimento em quartola de madeira, em que adquire um conjunto de compostos químicos, que se podem agrupar em dois grandes grupos: compostos de elevada massa molecular (polissacáridos – lenhina) e compostos de baixa massa molecular (orgânicos ou extraíveis) que são constituídos por moléculas mais simples, como ácidos, aldeídos, ésteres, cumarinas, lenhanas, fenil cetonas e por moléculas mais complexas, como os taninos (Roux, 1971; Lehtonen *et al.*, 1983; Piggott *et al.*, 1983; Canas, 2003; Belchior *et al.*, 2004; Caldeira, 2004).

Os trabalhos de Piggott *et al.*, (1983), Puech *et al.*, (1984), Canas (2003) e Caldeira (2004), entre outros, foram importantes para a compreensão da composição química da aguardente vínica envelhecida, que é vista como o somatório de uma enorme diversidade de compostos químicos voláteis e não voláteis, que têm origem no vinho, no destilado vínico e na quartola de madeira.

De acordo com o objectivo do presente trabalho, serão apresentados de forma detalhada os dois grupos de compostos químicos: de baixa e de alta massa molecular que fazem parte da composição química da aguardente vínica envelhecida.

### 1.2.1 Compostos de baixa massa molecular

A aguardente vínica branca é maioritariamente constituída por etanol e água. No entanto, para além destes compostos a aguardente branca apresenta uma grande diversidade de outros compostos voláteis (Nykänen *et al.*, 1983; Caldeira, 2004). A composição química do destilado vínico final, está intimamente relacionada com a composição química do vinho, isto é com as suas características, que dependem, para além do “terroir”, do grau de maturação e do estado de sanidade da uva, do processo de vinificação, nomeadamente do tratamento do mosto, do tipo de fermentação e das leveduras intervenientes (Ribéreau-Gayon *et al.*, 1982; Rizzon *et al.*, 1997) e do processo



de destilação do vinho. O valor e a qualidade do destilado vínico dependem assim da sua composição química volátil (Orriols, 2004).

Os principais grupos de compostos voláteis, para além do etanol, que podemos encontrar numa aguardente vínica sem envelhecimento são os seguintes (Orriols, 2004):

- aldeídos – constituem uma das fracções mais importantes de todos os destilados, têm origem no processo de fermentação da matéria-prima, pois dependem do tipo de leveduras e do processo de destilação. O composto químico mais abundante neste grupo é o acetaldeído ou etanal.
- acetais – o acetal é o composto químico, que se forma na reacção entre um aldeído e um álcool, formando-se um composto químico intermédiano, o hemiacetal, que posteriormente se combina com outra molécula de aldeído, originando o acetal, que pode sofrer hidrólise por acção de ácidos, quando o grau alcoólico é baixo. Se tivermos uma solução hidroalcoólica com um teor alcoólico elevado, cerca de 80,0 % v/v, a proporção de acetaldeído é igual a do acetal. O acetal quantitativamente mais importante na aguardente branca é o 1,1-dietoxietano (Puech *et al.*, 1984).
- cetonas – as cetonas mais importantes são a 3-hidroxi-2-butanona (vulgarmente designada por acetoína), a 2,3-butanodiona (ou diacetilo) e a 2,3-pentadiona. Este compostos formam-se por acção das bactérias lácticas e das leveduras, conferindo um aroma amanteigado ao destilado, a sua persistência está condicionada pela forma como se processa a destilação.
- álcoois superiores – estes compostos químicos têm um importante papel na definição do aroma do destilado. São formados durante a fase de fermentação do vinho, pelo ataque das leveduras aos aminoácidos. Os compostos químicos mais importantes desta família são o 1-propanol, o 2-metil-1-propanol (ou isobutanol), o 2-metil-1-butanol, o 3-metil-1-butanol, o 1-butanol, 2-butanol e o 2 propeno-1-ol (álcool alílico). A relação entre os álcoois isoamílicos é útil para caracterizar vinhos e destilados.
- metanol – é um constituinte das bebidas alcoólicas destiladas que não contribuir para o seu aroma final. Contudo, este composto químico, regula e avalia o bom cumprimento das Boas Práticas de Produção Vitivinícola (BPPV), por análise da sua toxicidade. Tem origem no vinho, e resulta da hidrólise das pectinas. A sua concentração

em bebidas espirituosas diminui ao longo do envelhecimento (Puech, 1984; Panosyan *et al.*, 2001).

- ésteres – estes compostos químicos formam-se durante o processo fermentativo, por acção das leveduras em meio de anaerobiose. O acetato de etilo e o lactato de etilo são os ésteres que existem em maior quantidade na aguardente branca, embora existam muitos outros compostos químicos desta família, como o acetato de isoamilo, acetato de hexilo, acetato de 2-feniletilo, hexanoato de etilo, octanoato de etilo, decanoato de etilo, etc.
- ácidos – tem origem no metabolismo fermentativo por acção das leveduras e das bactérias lácticas, passando para a aguardente durante a destilação, como por exemplo os ácidos etanóico, propanóico, butanóico, isobutanóico, isovalérico, etc; o mais importante é o ácido acético, que contribui com 80% para a fracção ácida do destilado.
- compostos terpénicos – tem sido identificados em aguardentes brancas os compostos terpénicos, como linalol,  $\alpha$ -terpineol, que têm origem nas uvas (Léauté, 1990) ou no vinho.
- compostos furânicos - na aguardente branca foi identificado o furfural que resulta da degradação térmica dos açúcares residuais do vinho, durante o processo de destilação (Onishi *et al.*, 1977; Granados *et al.*, 1996).

Durante o período de envelhecimento a aguardente vai enriquecer, também em compostos que resultam da reacções entre os compostos presentes no destilado. Assim verifica-se um aumento do teor em aldeídos, ao longo do processo de envelhecimento, devido a existência de reacções de oxidação do etanol (Puech *et al.*, 1984; Hitos *et al.*, 1995; Panosyan *et al.*, 2001, Watts *et al.*, 2003a).

Denota-se ao longo do envelhecimento a presença de reacções de oxidação de álcoois primários e de aldeídos originando ácidos. Ocorrem, também reacções de acetalização que resultam num aumento do teor de dietilacetal (1,1-dietoximetano) ao longo do envelhecimento (Puech, 1984; Panosyan *et al.*, 2001).

Surgem ao longo do envelhecimento algumas cetonas, as quais se encontram relacionadas com um descritor organoléptico do Cognac, o “rantio charentais” (Vidal *et al.*, 1992). Pensa-se que estas cetonas resultam da oxidação dos ácidos gordos (Marché *et al.*, 1975) e o seu teor aumenta com o período de envelhecimento (Puech, 1984; Watts *et al.*, 2003b).

Masuda *et al.*, (1980) dosearam a damascenona [*trans*-(2,6,6-trimetil-1-crotonil)-ciclohexe-1,3-diona], que apresenta um aroma floral em bebidas espirituosas. Do conjunto de bebidas estudadas verificou-se que os brandies apresentavam teores superiores desta cetona.

O trabalho de Puech *et al.*, (1984) evidencia a evolução de álcoois superiores no Cognac ao longo do seu envelhecimento. A concentração destes compostos aumenta de forma lenta, ao longo do período de envelhecimento, com excepção do 2-feniletanol que aumenta de forma gradual e do 2-butanol que foi doseado apenas em Cognac com mais de 25 anos de envelhecimento, sendo a sua concentração relativamente baixa, quando comparada com os outros álcoois. O trabalho de Hitos *et al.*, (1995) sobre as características analíticas do Brandy de Jerez, ao longo de período de envelhecimento (6 meses, 1 ano, 3 anos) apoiam as conclusões apresentadas por Puech *et al.*, (1984), para esta família de compostos químicos. Os trabalhos de Panosyan *et al.*, (2001) confirmam os resultados obtidos anteriormente, por Puech *et al.*, (1984) e Hitos *et al.*, (1995), demonstrando o aumento do teor de álcoois superiores, como o 2-butanol, o 1-butanol, o 1-propanol, o álcool alílico, o 1-hexenol, o 2-metil-1-propanol, o 2+3-metil-1-butanol, em Cognac ao longo de período de envelhecimento (Panosyan *et al.*, 2001).

As aguardentes vínicas envelhecidas apresentam na sua composição outros álcoois como o metanol, o 2-metil-1-butanol entre outros cujo teor varia com o período de envelhecimento (Puech *et al.*, 1984; Caldeira, 2004).

O teor de ácido acético aumenta ao longo do envelhecimento, devido à oxidação do acetaldeído, que resulta da oxidação do etanol e também da extracção deste composto da madeira (Reazin, 1981; Nishimura *et al.*, 1983; Hitos *et al.*, 1995) como resultado da degradação das hemiceluloses, que têm na sua constituição radicais acetilo. No entanto, uma fracção de ácido acético, por esterificação origina o acetato de etilo (Hitos *et al.*, 1995) cujo teor aumenta ao longo do processo de envelhecimento (Puech *et al.*, 1984). Os ácidos gordos, podem ter origem na destilação do vinho, ou na hidrólise dos ésteres que ocorre em meio ácido e a temperatura elevada durante a destilação (Watts *et al.*, 2003b). Os trabalhos de Puech *et al.*, (1984) indicam que os valores de acidez total, de acidez volátil e de acidez fixa das bebidas alcoólicas destiladas aumentam ao longo do período de envelhecimento. Nos trabalhos, Puech *et al.*, (1984) foram doseados, para além do ácido acético, outros ácidos como, o ácido hexanóico, o ácido octanóico, o ácido decanóico, o

ácido dedocanóico, o ácido tetradecanóico, o ácido hexadecanóico, o ácido cis-9-hexadecenóico, o ácido octadecanóico, o ácido cis-9-octadecenóico, o ácido 9,12-octadecadienóico e o ácido 9,12,15-octadecatrienóico, verificando-se que os seus teores evoluíam de forma não linear ao longo do período de envelhecimento estudado (1, 3, 5, 10, 15, 25, 50 anos) (Puech *et al.*, 1984).

A fracção de ácidos gordos, como os ácidos: octanóico, decanóico e dedocanóico surge em maior quantidade quando comparado com os outros ácidos, tais como: propanóico, butanóico, isopropilacético e hexanóico, nas bebidas destiladas (cognac e uísques) (Piggott *et al.*, 1993). Durante o envelhecimento, demonstra-se que a concentração de ácidos gordos nas bebidas espirituosas tende a aumentar (Conner *et al.*, 1999a; Caldeira, 2004).

Um éster etílico, presente no Cognac é o acetato isoamílico cuja concentração aumenta ao longo do período de envelhecimento (Panosyan *et al.*, 2001). No trabalho de Caldeira (2004) foram identificados nas aguardentes 11 ésteres etílicos, como por exemplo: o butanoato de etilo, 2-metil-butanoato de etilo, pentanoato de etilo, hexanoato de etilo, lactato de etilo, octanoato de etilo, acetato de isoamilo, ... (Caldeira, 2004). O acetato de etilo, que representa cerca de 80% dos ésteres presentes nas aguardentes, é considerado um marcador de envelhecimento, tendo origem na reacção entre o ácido acético e o etanol (Reazin, 1981), que implica um aumento do seu teor ao longo do envelhecimento no Cognac (Puech *et al.*, 1984 e Hitos *et al.*, 1995).

Foram indetificados em aguardentes vínicas envelhecidas, por Caldeira em 2004, dois compostos terpénicos, o  $\alpha$ -terpineol e o linalol (Caldeira, 2004).

Neste contexto, durante o período de envelhecimento em quartolas de madeira, ocorre o enriquecimento da aguardente vínica em compostos químicos de diferentes famílias, que resultam da degradação: da celulose, da hemicelulose e da lenhina, que constituem os componentes maioritários da madeira (Canas *et al.*, 1999; Piggott *et al.*, 2000). Assim, durante o envelhecimento o destilado extraído da madeira vários grupos de compostos designadamente derivados furânicos e ácido acético (Onishi *et al.*, 1977; Rabier *et al.*, 1991; Canas, 2003; Caldeira, 2004), açúcares (Belchior *et al.*, 1972; Marché *et al.*, 1975; Cantagrel *et al.*, 1992a), aldeídos fenólicos (Bricout, 1971; Belchior *et al.*, 1972; Puech *et al.*, 1984; Canas, 2003; Caldeira, 2004), ácidos fenólicos (Guymon 1970; Belchior e Carneiro, 1972; Joseph *et al.*, 1972; Puech, 1978; Puech *et al.*, 1984; Viriot *et*

*al.*, 1993; Canas, 2003), fenóis voláteis (Artajona *et al.*, 1991; Caldeira, 2004), cumarinas (Bricout, 1971; Joseph *et al.*, 1972; Delgado *et al.*, 1987; Puech *et al.*, 1992; Canas, 2003); lenhanas (Nabeta *et al.*, 1987; Rabier *et al.*, 1991) e taninos (Guymon, 1970; Puech *et al.*, 1985).

### ***Aldeídos fenólicos/Ácidos fenólicos***

Os aldeídos fenólicos (vanilina, siringaldeído, coniferaldeído e sinapaldeído) não são quantificáveis na aguardente jovem. Os trabalhos de Viriot *et al.*, (1993) referem que as lenhinas da madeira de carvalho são parcialmente solubilizadas durante o envelhecimento das aguardentes, estando na origem dos aldeídos e dos ácidos fenólicos tais como a vanilina, siringaldeído, ácido vanílico e ácido siringico.

A concentração dos aldeídos de estrutura do tipo guaiacilo, também designado por aldeídos cinâmicos (vanilina e coniferaldeído) e do tipo siringilo, denominado por aldeídos benzóicos (siringaldeído e sinapaldeído) aumenta no decurso do envelhecimento (Puech *et al.*, 1984; Hitos *et al.*, 1995; Canas, 2003; Caldeira, 2004).

Atendendo à importância sensorial da vanilina na aguardente vínica envelhecida (Caldeira, 2004), o aumento da concentração deste composto químico (vanilina) em solução é considerado um marcador do seu envelhecimento. A sua acumulação aumenta de forma linear, que é justificado pela intensidade das reacções de extracção deste composto durante o primeiro ano de envelhecimento (Canas, 2003), e da formação da vanilina, como resultado da degradação da lenhina (Goméz-Cordovés *et al.*, 1997).

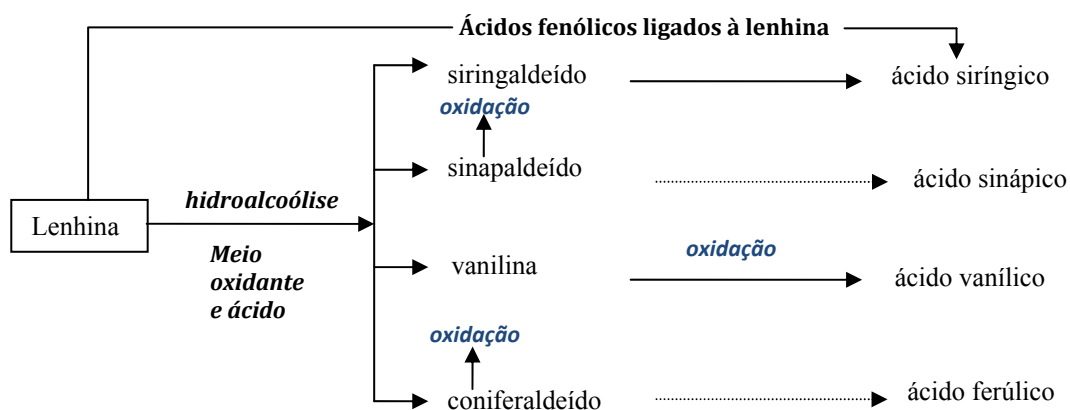
Verifica-se que após quatro anos de envelhecimento, há um aumento significativo de aldeídos fenólicos, pela predominância das reacções de oxidação, face à diminuição das reacções de extracção (Canas *et al.*, 2004). Uma ligeira diminuição do coniferaldeído e do sinapaldeído durante esta fase, traduz-se num pequeno aumento da concentração de vanilina e siringaldeído (Puech *et al.*, 1984; Canas *et al.*, 2004).

De acordo com os trabalhos realizados por Delgado *et al.*, (1990) e Spillman *et al.*, em 1997, no âmbito do envelhecimento de vinhos e de bebidas espirituosas usando quartolas de carvalho, constatou-se que as razões de sinapaldeído/ácido vanílico, de ácido gálgico/vanilina de vanilina/coniferaldeído, de vanilina/ácido vanílico e de

siringaldeído/vanilina são indicadores da qualidade das bebidas espirituosas e dos vinhos e comprovam a sua genuidade (Delgado *et al.*, 1990; Spillman *et al.*, 1997).

Gómez-Cordovés (1997) doseou o composto 2,3-dihidroxi-1-guaiacilopropan-1-ona que se caracterizou como sendo um indicativo da autenticidade dos brandies.

A lenhina presente na madeira de carvalho é constituída por lenhinas extraíveis e insolúveis (Puech *et al.*, 1985). As primeiras, são extraídas em meios hidroalcoólicos (figura 1.3), como a aguardente vínica, sendo favorecida a sua extracção pela presença de ácidos, que promove a acumulação de aldeídos fenólicos e ácidos fenólicos como os ácidos gálgico e elágico e certos carboidratos (glucose, galactose, xilose, arabinose, ribose, entre outros).



**Figura 1.3–Mecanismo de degradação da lenhina e compostos derivados propostos por Puech *et al.* (1990).**

De acordo com o mecanismo de degradação da lenhina apresentado por Puech *et al.* (1990), os ácidos siríngico e vanílico deverão resultar da oxidação dos aldeídos benzóicos correspondentes ou dos aldeídos cinâmicos por via indirecta. Relativamente, ao ácido ferúlico apenas uma reduzida fracção tem origem na oxidação do coniferaldeído (Canas, 2003).

Os ácidos fenólicos doseados por Puech *et al.*, em 1984, foram o ácido gálgico, ácido protocatético, o ácido benzóico, ácido vanílico, ácido siríngico, o ácido p-cumárico, o ácido ferúlico e o ácido cinâmico, que resultam da degradação térmica dos aldeídos fenólicos ligados a lenhina em meio ácido, como consequência do aumento da temperatura (Puech *et al.*, 1984).

Tendo em consideração os trabalhos de Puech *et al.*, (1984), torna-se evidente que o aumento da concentração de ácido vanílico, siríngico e ferúlico nas aguardentes, de acordo com a intensidade da queima das quartolas onde se processa o seu envelhecimento, é resultado das reacções de degradação térmica e de hidroalcoólise da lenhina e dos aldeídos fenólicos, vanilina, siringaldeído e coniferaldeído, na devida ordem, no decurso do envelhecimento (Puech *et al.*, 1984).

De acordo com os resultados de Canas (2003), do conjunto dos ácidos fenólicos, as aguardentes envelhecidas em madeira de castanheiro caracterizam-se por apresentar maior teor em ácido gálico. Enquanto que, as aguardentes envelhecidas em madeiras de carvalho francês e americano apresentam baixo teor deste ácido e as aguardentes envelhecidas em madeira de carvalho português ocupam uma posição intermédia (Canas, 2003). Neste contexto o ácido gálico é considerado um bom marcador do envelhecimento desta bebida alcoólica em madeira de castanheiro (Canas, 2003). A concentração de ácido ferúlico permite fazer a discriminação entre as aguardentes vínicas envelhecidas em madeira de carvalho português de diferentes origens geográficas (Canas, 2003). Em conclusão, o teor em ácido gálico nas aguardentes vínicas, permite fazer a distinção entre as que são envelhecidas em madeira de castanheiro e carvalho (Canas, 2003).

O ácido elágico tem origem na hidrólise parcial dos taninos elágicos e dos taninos gálicos (Canas, 2003; Jordão, 2005). Este ácido é o composto químico principal, do ponto de vista quantitativo, dos compostos químicos extraíveis da madeira de carvalho e está presente nas aguardentes vínicas envelhecidas nessas madeiras (Canas, 2003).

A concentração dos ácidos fenólicos aumenta ao longo do período de envelhecimento (Puech *et al.*, 1984; Hitos *et al.*, 1995, Casanova, 2007).

### ***Fenóis voláteis/fenilcetonas***

Os fenóis voláteis constituem um pequeno grupo de compostos de aroma, tendo o trabalho de Caldeira (2004) demonstrado a importância odorante, de alguns destes compostos, na aguardente vínica envelhecida.

O trabalho desenvolvido por Caldeira (2004) permitiu identificar na aguardente vínica envelhecida em madeira de carvalho, o 4-alilsiringol (identificado pela primeira vez em aguardentes) e o siringol, verificando-se que a intensidade da queima influencia o

seu teor nesta bebida destilada. Outros, fenóis voláteis identificados foram o guaiacol, o 4-metilsiringol, o 4-etilguaiacol, o eugenol e o 4-etilfenol.

O guaiacol, o *m*-cresol e o eugenol foram doseados em soluções hidroalcoólicas de extractos de madeira (Piggott *et al.*, 1983).

Os fenóis voláteis doseados na aguardente envelhecida em madeira (Puech, 1987), podem ter origem quer na madeira, quer na degradação dos ácidos fenólicos (Canas, 2003).

As fenil cetonas são libertadas durante o processo de queima da madeira (Maga, 1985; Chatonnet *et al.*, 1989).

A acetovanilona foi doseada em aguardentes vínicas envelhecidas (Nishimura *et al.*, 1983; Silva, 2006). A presença da etilvanilina foi doseada em aguardente envelhecidas por Vlassov *et al.*, (1999) e Silva (2006) por cromatografia líquida de alta resolução (HPLC).

### ***Ésteres fenólicos***

Foram identificados ésteres fenólicos, como o benzoato de metilo e o benzoato de etilo em Cognac por Heide (1978) (Heide *et al.*, 1978).

### ***$\beta$ -metil- $\gamma$ -octalactona***

A  $\beta$ -metil- $\gamma$ -octalactona ( $\gamma$ -lactona do ácido 4-hidroxi-3-metil-octanóico) é um composto volátil presente na madeira de carvalho, que é extraído durante a fase de envelhecimento para a aguardente vínica envelhecida (Masson *et al.*, 2000).

Este composto, inicialmente identificado em uísques, foi detectado pela primeira vez em madeiras de carvalho por Masuda *et al.*, (1971), tendo sido posteriormente identificado em aguardentes velhas (Guymon *et al.*, 1972; Otsuka *et al.*, 1974).

O teor da  $\beta$ -metil- $\gamma$ -octalactona aumenta com o período de envelhecimento em aguardentes vínicas envelhecidas e em uísques (Otsuka *et al.*, 1974; Otsuka *et al.*, 1987a; Otsuka *et al.*, 1987b; Puech *et al.*, 1984; Caldeira, 2004) sendo considerada por alguns autores, como um marcador de envelhecimento (Puech *et al.*, 1984).



Os estudos de Snakkers em (2000) e de Prida em (2007) têm como apoio os trabalhos de Watherhouse em (1994) realizados em vinhos brancos, e de Guichard em (1995) em brandies, que permitiram dosear os quatros esteroisómeros da  $\beta$ -metil- $\gamma$ -octalactona, onde se verifica que o tipo de madeira utilizada no envelhecimento, influência o teor dos enantiómeros da  $\beta$ -metil- $\gamma$ -octalactona (Watherhouse *et al.*, 1994; Guichard *et al.*, 1995; Snakkers *et al.*, 2000; Prida *et al.*, 2007).

### ***Aldeídos furânicos***

Os trabalhos de Onishi (1977) evidenciaram que a reacção de extracção dos aldeídos furânicos é condicionada por diversos factores, como a duração da fase de envelhecimento, a espécie botânica de madeira utilizada para o fabrico das quartolas, o volume, isto é o tamanho da quartola e a sua idade (quartola nova, ou usada) (Onishi *et al.*, 1977). No período de envelhecimento surgem outros aldeídos furânicos na aguardente vínica, que resultam da extracção dos compostos furânicos da vasilha de madeira para o destilado vínico. Verificou-se que a utilização de quartolas de carvalho americano no envelhecimento de bebidas espirituosas origina um aumento da concentração de furfural e de 5-hidroximetilfurfural, comparativamente com à utilização de quartolas de carvalho francês.

O trabalho de Granados *et al.*, em (1996) evidenciou uma outra fonte de obtenção de derivados furânicos em brandies comerciais, designadamente a adição de caramelo, tratamento autorizado no acabamento das aguardentes vínicas, o que contribui para a presença de furfural e 5-hidroximetilfurfural nas aguardentes velhas comerciais. Este trabalho mostrou que a adição de caramelo à aguardente, está relacionado com o aumento do teor de furfural e de 5-hidroximetilfurfural (Pons *et al.*, 1991; Granados *et al.*, 1996a; Granados *et al.*, 1996b).

Os teores de aldeídos furânicos das aguardentes aumentam ao longo do período de envelhecimento (Hitos *et al.*, 1995; Canas, 2003; Caldeira, 2004) sendo este aumento mais notório no primeiro ano de envelhecimento (Canas, 2003).

O trabalho realizado para avaliar a genuidade das bebidas espirituosas, por Canas *et al.* (2004), evidencia que a madeira de castanheiro apresenta um teor mais elevado de 5-metilfurfural do que de furfural, verificando-se o inverso para a madeira de carvalho, logo

a concentração destes derivados furânicos depende da espécie botânica, o que está de acordo com os trabalho de Onishi *et al.* (1977).

Os trabalhos de Caldeira (2004) e Canas (2003) em aguardentes vînicas envelhecidas demonstraram que a intensidade da queima implica um aumento significativo nos teores de furfural, 5-hidroximetilfurfural e 5-metilfurfural.

### ***Outros compostos***

Para além dos compostos voláteis, o destilado vînico extrai da madeira compostos químicos não voláteis, como cumarinas e lenhanas (Puech *et al.*, 1984; Canas, 2003).

As cumarinas têm origem nos ácidos hidroxicinâmicos (Masson *et al.*, 1996). Durante o envelhecimento das aguardentes vînicas, torna-se notável o aumento da concentração da escopoletina (Puech *et al.*, 1988; Canas 2003). O teor de umbeliferona nas aguardentes vînicas envelhecidas é determinado pela espécie botânica da madeira, e pelo tipo de queima (Canas, 2003).

### ***Açúcares***

Os açúcares são um importante grupo de compostos identificados em aguardentes vînicas envelhecidas; a concentração destes compostos aumenta ao longo do período de envelhecimento (Cantagrel *et al.*, 1992a; Cantagrel *et al.*, 1992b; Cantagrel *et al.*, 1992c; Hitos *et al.*, 1995).

A maioria das moléculas de açúcar extraídos do Brandy de Jerez provém da degradação das hemiceluloses e da lenhina, pois estas são facilmente hidrolisáveis em meio ácido (Hitos *et al.*, 1995). Verifica-se que há um aumento da concentração de açúcares como ramnose, arabinose, xilose, galactose ao longo do período de envelhecimento (Hitos *et al.*, 1995). O trabalho de Joseph *et al.*, em (1972) revela que na fase inicial de envelhecimento do destilado vînico há uma predominância das pentoses (arabinose e xilose), contudo após um período de dez a quinze anos de maturação verifica-se que são as hexoses, como a glucose e levulose, as moléculas predominantes no destilado vînico (Joseph *et al.*, 1972).

### 1.2.2 Compostos de elevada massa molecular

Na década de setenta, os trabalhos de Jouret em (1975) evidenciaram que a concentração de lenhina aumenta no Armagnac com o período de envelhecimento. Contudo os trabalhos de Deibner *et al.*, (1976) demonstraram que existe um aumento inicial de lenhina, passando a verificar-se uma estabilização da sua concentração, que tem como base a pequena solubilidade dos seus constituintes em solução com título alcoométrico progressivamente mais baixo (Canas, 2003). Os trabalhos de Puech *et al.*, (1985) indicaram que somente 4% da lenhina da madeira de carvalho está presente na fase inicial do envelhecimento do Armagnac. Os resultados obtidos por Viriot *et al.*, em 1993 sustentam, a afirmação anterior, dado que evidenciam que a concentração de elagitaninos solúveis e da lenhina em brandies com idades compreendidas entre 0 e 30 anos, aumenta de forma gradual ao longo do período de envelhecimento. Pelos resultados obtidos por Puech *et al.*, (1985) e Viriot *et al.*, (1993) constata-se que durante os primeiros anos de envelhecimento, se denota um equilíbrio entre taninos e lenhina na aguardente vínica, pelo facto da maior solubilização, em meio hidroalcoólico, dos taninos relativamente à lenhina (Puech *et al.*, 1985; Viriot *et al.*, 1993). Ao longo do envelhecimento devido à predominância das reacções de hidrólise e de oxidação, que são responsáveis pela degradação dos taninos presentes, verifica-se uma maior proporção de oligómeros da lenhina (Canas, 2003).

Na família dos taninos, existem dois grupos, os taninos condensados e os taninos hidrolisáveis. Estes últimos podem agrupar-se em duas classes os galhotaninos e elagitaninos que são polímeros do ácido gálico e elágico, respectivamente.

Os taninos são compostos com capacidade para complexar as proteínas (Haslam *et al.*, 1989). A sua concentração na aguardente vínica envelhecida aumenta ao longo do tempo (Baldwin *et al.*, 1974; Puech *et al.*, 1984, Puech *et al.*, 1985). Relativamente aos taninos da madeira a aguardente vínica revela uma grande capacidade extractiva. Assim, Puech *et al.*, (1985) ao estudar a evolução da composição química de uma aguardente Armagnac, comparativamente em quartola nova e quartola usada verificou que a aguardente extrai 41 a 66 % dos taninos disponíveis na madeira.

### 1.2.3 Controlo de qualidade da aguardente vínica envelhecida

As aguardentes vínicas envelhecidas encontram-se bem divulgadas no mercado nacional e estrangeiro, apresentando um valor económico importante. Elas apresentam características muito próprias, cujo valor varia consoante a casta, o clima, o sistema de produção e período de envelhecimento.

Sob o ponto de vista legal a qualidade da aguardente vínica envelhecida, em Portugal, é regida pelos Regulamentos n.º 110/2008 (de 15 de Janeiro de 2008) e n.º 2523/97 (de 16 de Dezembro de 1997), em que se referem respectivamente, as regras gerais relativas à definição, à designação e à apresentação das bebidas espirituosas, e os parâmetros analíticos mínimos para o controlo das suas características analíticas. De acordo com esta legislação a aguardente vínica envelhecida (brandy) deve apresentar:

- um teor de substâncias voláteis igual ou superior a 125 g/hl de álcool a 100 % v/v;
- um teor máximo de álcool metílico de 200 g/hl de álcool a 100 % v/v.

Para além destes parâmetros, existem outros, que constituem importantes indicadores da evolução da aguardente vínica, como o título alcoométrico volúmico, a acidez total, o extracto seco total, a intensidade da cor e o índice de polifenóis totais. De modo semelhante, a avaliação sensorial constitui uma importante ferramenta para o controlo da sua qualidade. As metodologias disponíveis para estas determinações são as que constam na regulamentação para o sector vitivinícola (OIV, 1994; Belchior e Carvalho, 1984; Regulamento n.º 2870/2000; NP 3263/1990). Para o caso das aguardentes vínicas de qualidade produzidas em Região Demarcada, com DOC, há ainda a respeitar a especificidade própria, expressa normalmente pelo Regulamento respectivo, onde constam as regras desde a produção até ao processo de envelhecimento.

Para além disso, as empresas de manufactura deste produto, desde o dia 1 de Janeiro de 2006, estão abrangidas pelo Regulamento (CE) n.º 852/2004 de 29 de Abril de 2004, que enumera os requisitos a cumprir no que se refere ao pessoal, às instalações, aos meios de transporte, aos equipamentos, ao abastecimento de água e ao tratamento de resíduos (Regulamento CE n.º 852/2004).

Assim, o controlo de qualidade deste produto, é uma necessidade crescente que surge pela grande variabilidade de compostos químicos que se formam durante a fermentação do vinho, pela possibilidade de perdas ou misturas das fracções voláteis (caudas, cabeças e coração) durante a destilação e a sua eventual contaminação, pela existência de condições

higieno-sanitárias precárias e pelo não cumprimento das Boas Práticas de Produção Vitivinícola.

Por outro lado, o controlo de qualidade visa também despistar eventuais situações de contrafacção de bebidas, por adição de água, de álcool, de aromas ou de corantes (Nagato *et al.*, 2001).

### **1.3 Espectroscopia de infravermelho - *Princípios básicos***

Sir Isaac Newton, em 1666 demonstrou que a luz solar pode ser decomposta pelas cores do arco-íris (vermelho, laranja, amarelo, verde, anil, azul ou indigo e violeta) ao atravessar um prisma. Passados quase dois séculos desta descoberta, William Herschell em 1800 realizou uma experiência, que tinha como objectivo quantificar a quantidade de calor associada a cada cor, que constitui a luz solar. Verificou que existia um aumento da temperatura da luz azul para a luz vermelha do espectro criado pela luz do sol ao atravessar o prisma de cristal, em que a temperatura mais elevada era atingida para além da luz vermelha, numa região, não abrangida pela luz visível. Herschel concluiu que existiria um “outro tipo de luz” invisível nessa região, que designou por infravermelho.

Os princípios básicos subjacentes à análise por espectroscopia de infravermelho, são conhecidos há mais de 100 anos. Em 1892, os trabalhos de Julius demostraram que o radical metilo induz diferentes absorções da molécula de metano na região do infravermelho (Pasquini, 2003). Coblentz em 1903 apresentou um trabalho, onde compilou centenas de espectros de substâncias orgânicas e inorgânicas (Pasquini, 2003). No entanto, como consequência das limitações instrumentais da época, a obtenção de um espectro era uma tarefa difícil, árdua, e morosa porque cada ponto do espectro tinha que ser medido em separado.

A Segunda Guerra Mundial foi o acontecimento histórico que marcou o desenvolvimento da espectroscopia de infravermelho como técnica de análise, tendo sido utilizada no controlo da concentração e grau de pureza do butadieno utilizado na síntese de borrachas sintéticas. No entanto, só em 1970 foi reconhecido amplamente o seu potencial, como uma ferramenta de análise.

A espectroscopia de infravermelho proporciona vantagens nas áreas da produção e controlo de qualidade. De tal modo, que é notória a crescente importância que lhe é atribuída quer em laboratórios de análise, quer no controlo de qualidade dos processos industriais, tais como na indústria farmacêutica, alimentar, têxtil, petroquímica, etc.

Este facto é justificado pelas suas potencialidades, que se traduzem na realização de uma análise sem destruição e, muitas vezes, sem tratamento prévio das amostras, na robustez do aparelho, na rapidez e facilidade de execução bem como na selectividade da técnica (Borin, 2003).

A espectroscopia de infravermelho é classificada como uma técnica analítica versátil e universal de análise estrutural para uma grande variedade de amostras orgânicas, inorgânicas e biológicas, podendo ser utilizada para determinações qualitativas e quantitativas (Borin, 2003; Gallignani *et al.*, 2004). As técnicas espectroscópicas traduzem a interacção das moléculas com a radiação electromagnética, havendo alteração do seu momento dipolar.

A radiação infravermelha na gama compreendida entre 10 000 e 100  $\text{cm}^{-1}$  quando absorvida por uma molécula converte-se em energia de vibração molecular, sendo quantificada sobre a forma de um espectro, que evidencia um conjunto de bandas em vez de linhas. A frequência ou o comprimento de onda de uma absorção depende: da massa relativa dos átomos, das constantes de forças, do tipo de ligações estabelecidas na molécula e da geometria dos átomos (Silverstein e Webster, 2000).

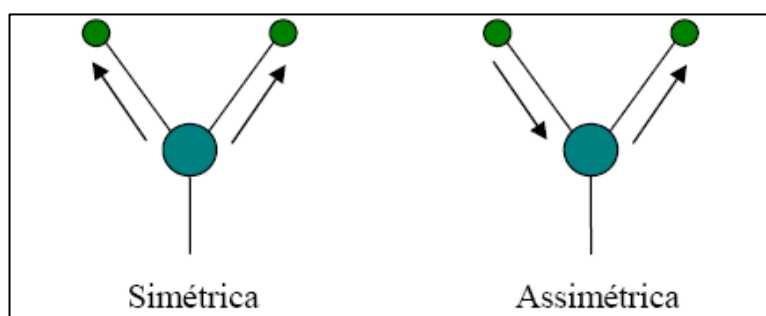
Assim, quando se faz incidir um feixe de fotões com intensidade  $I_0$  sobre uma amostra de moléculas que apresentam energia de vibração incompatível com a energia do feixe, não há absorção da sua energia e consequentemente não há alteração do seu movimento vibracional, isto é, a intensidade  $I$  do feixe que emerge da amostra, tem a mesma intensidade que a intensidade  $I_0$  do feixe incidente.

No entanto, se a energia dos fotões for compatível com a energia vibracional, cada molécula absorverá um fotão de energia, aumentando o seu movimento vibracional. Consequentemente a intensidade dos fotões que é libertado da amostra é menor do que a intensidade incidente ( $I_0 > I$ ) uma vez, que uma parte dos fotões é absorvida. Deduz-se que quanto maior for o número de moléculas presentes na amostra, menor será a intensidade final, pois maior será a hipótese dos fotões serem absorvidos (Skoog *et al.*, 1999).

De acordo com a revisão de Pasquini (2003), são apresentados vários modelos para explicar o comportamento vibracional das moléculas, porém nenhum deles é tão eficiente como o modelo da esfera-mola. De acordo com este modelo, os átomos são representados por esferas de tamanho variável e as ligações entre eles são descritas por molas com elasticidade variável.

Neste modelo uma molécula encontra-se na posição de repouso, para a temperatura de 0 K. Se o sistema estiver a uma temperatura diferente, as moléculas estão sujeitas a movimentos de vibração, que são representados pelos vários estados de estiramento da “mola”. Estas vibrações e os seus respectivos estados de estiramento dependem fundamentalmente do tipo de átomos envolvidos e da força de ligação. Consoante estes factores, cada vibração apresenta um valor de energia característico, designado por energia vibracional.

As vibrações moleculares podem ser classificadas em deformações axiais e angulares. Uma vibração de deformação axial é traduzida por um movimento rítmico ao longo do eixo da ligação. As vibrações de deformação angular correspondem a variações ritmadas das ligações que têm um átomo em comum ou o movimento de um grupo de átomos em relação ao resto da molécula sem que as posições relativas dos átomos do grupo se alterem. As vibrações de deformação angular envolvem alterações dos ângulos de ligação em relação a um conjunto de coordenadas arbitrário da molécula (Silverstein e Webster, 2000). Os diferentes tipos de vibração são apresentados nas figuras 1.4 e 1.5.



**Figura 1.4-**Modos de vibração molecular-Alongamento (Skoog *et al.*, 2002).

As vibrações de deformação angular apresentam quatro modos de vibrações: tesoura (*scissoring*), balanço (*rocking*), abanar ou “sacudir” (*wagging*) e torção (*twisting*) (Skoog *et al.*, 2002), ilustradas na figura 1.5.

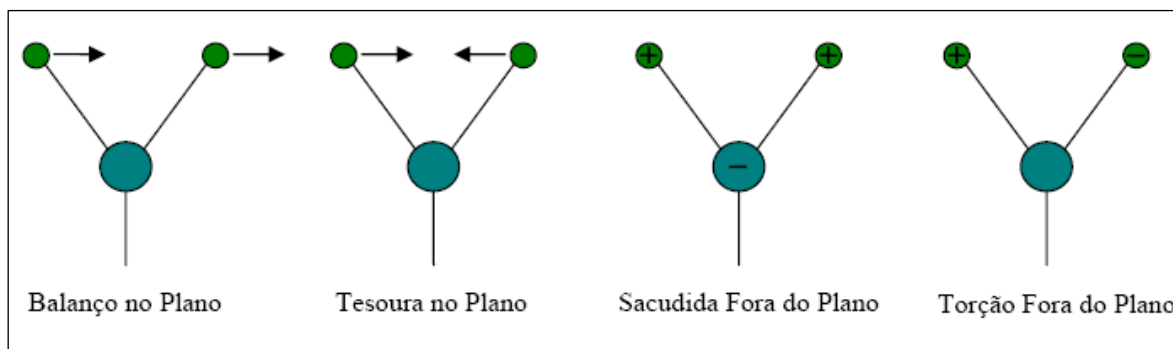


Figura 1.5-Modos de vibração molecular-Deformação (Skoog *et al.*, 2002).

### 1.3.1 Infravermelho próximo (NIR) e médio (MIR)

A gama de comprimentos de onda que corresponde a região do infravermelho médio (MIR) situa-se entre  $4000$  a  $400\text{ cm}^{-1}$ , indica a zona de maior interesse para a caracterização molecular. O infravermelho próximo (NIR) localiza-se entre  $14000$ – $4000\text{ cm}^{-1}$ . A espectroscopia no infravermelho médio e próximo quando associado a técnicas quimiométricas são utilizadas no controlo de qualidade de diversos produtos.

Os espectros no infravermelho de compostos químicos poliatômicos covalentes são extremamente complexos, pois são constituídos por inúmeras bandas de absorção, que revelam a natureza das interações entre as moléculas e a sua vizinhança, dado que a frequência e a absortividade provocadas por uma determinada ligação química denunciam pequenas alterações quando se altera a sua vizinhança.

O espectro de infravermelho é considerado a impressão digital de um composto químico. Deste modo, a espectroscopia de infravermelho pode ser usada para identificar um composto ou investigar a composição de uma amostra. A figura 1.6 ilustra a zona de absorção, compreendida entre  $4000$  e  $900\text{ cm}^{-1}$ , que normalmente, é designada por região dos grupos funcionais, uma vez que a maioria dos grupos funcionais de interesse para a química orgânica possuem valores de absorvâncias relativamente invariáveis, neste intervalo de número de onda.

A presença de um pico de absorvância na região de um grupo funcional no espectro de infravermelho é quase sempre uma indicação da sua existência na molécula. De maneira análoga, a não existência de uma banda nesta região significa que aquele grupo funcional em particular está ausente.



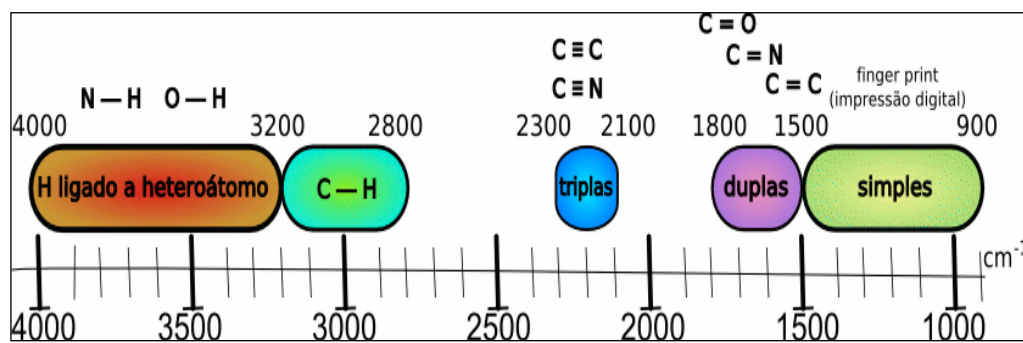


Figura 1.6 -Absorções registradas no IV (Ramos, 2006).

Outra importante aplicação do infravermelho é a análise quantitativa de misturas de compostos químicos, isto porque a intensidade de uma banda de absorção é proporcional à concentração do componente que a provocou, logo a quantidade de um composto presente numa amostra pode ser determinada através da curva de calibração, que se traduz pela intensidade da banda *versus* concentração. A curva de calibração é construída a partir de amostras com concentrações conhecidas do composto em estudo. No entanto, quanto mais complexa é a amostra, ou seja, quanto maior o número de interferentes presentes, mais difícil torna-se elaborar uma calibração univariada, torna-se por este motivo, necessário recorrer a calibração multivariada, (ver capítulo 1.4).

### 1.3.2 Espectroscopia de Infravermelho com Transformadas de Fourier (FT-IR)

O avanço da espectroscopia de infravermelho (NIR e MIR) como técnica de análise quantitativa está associado à combinação da Transformada de Fourier com a nova geometria dos espectrofotómetros, isto é com a utilização do interferómetro de Michelson. O interferómetro de Michelson ilustrado na figura 1.8, divide o feixe da radiação policromática em dois feixes de igual potência através da reflexão parcial por um espelho móvel, a associação dos feixes de radiação gera combinações que podem ser medidas em função da diferença do trajecto óptico percorrido pelos feixes (WineScan FT120, Foss, 2000).

O interferómetro é constituído por dois espelhos (espelho móvel e espelho fixo), por uma lâmina separadora, por uma fonte de luz e um detector. Na maioria dos instrumentos de análise baseados em interferogramas, o sinal luminoso gerado pelo interferómetro atravessa continuamente a amostra, havendo detecção da radiação transmitida ou reflectida por um detector apropriado. O somatório dos sinais detectados representa o conjunto de

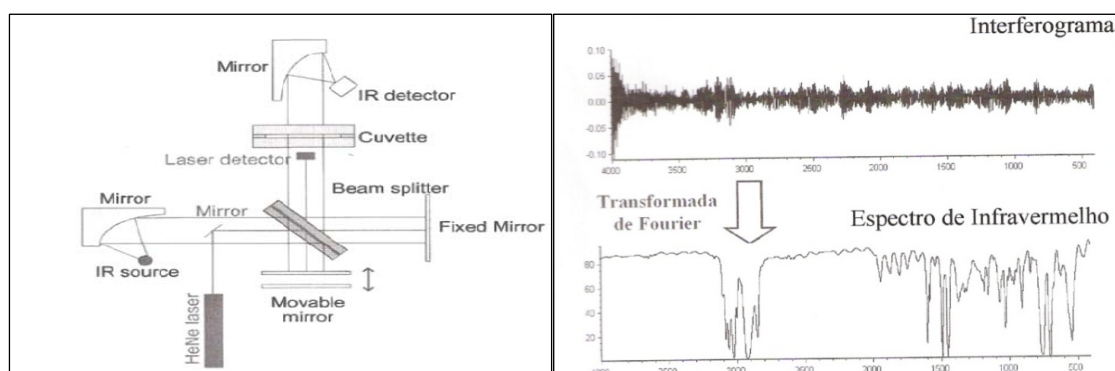
todos os comprimentos de onda da radiação emitida pela fonte luminosa, que é absorvida pelos componentes da amostra. A informação do interferograma, é decodificada pelo cálculo da Transformada de Fourier, por acção de um microprocessador acoplado ao espectrofotómetro, permitindo obter a distribuição da energia absorvida pela amostra ou pelo espectro da amostra por cada comprimento de onda. O algoritmo das Transformadas de Fourier permite decompor a intensidade da energia luminosa do interferograma ( $y$ ), na soma das funções senos e co-senos da frequência da radiação luminosa ( $x$ ) e na velocidade de deslocação dos espelhos ( $n\omega$ ) como se evidencia nas equações:

$$y = a_0 \sin(0\omega x) + b_0 \cos(0\omega x) + a_1 \sin(1\omega x) + b_1 \cos(1\omega x) + \dots \quad (2.1)$$

$$y = \sum_{n=-\infty}^{\infty} [a_n \sin(n\omega x) + b_n \cos(n\omega x)] \quad (2.2)$$

Em que:  $\omega = \frac{2\pi}{x_2 - x_1}$ , e  $x_2 - x_1$  é o intervalo das abcissas.

A figura 1.7 representa um esquema simplificado do interferómetro de Michelson e do princípio de operação do aparelho WineScan FT120 utilizado na realização das análises deste trabalho. A amostra é colocada entre o detector e o interferómetro Michelson, sendo o sinal produzido captado por este. O sinal final é calculado por microcomputador após subtracção do interferograma de referência relativamente ao interferograma da amostra. Em seguida, o microcomputador efectua a Transformada de Fourier e recorrendo à razão dos espectros transformados reconstitui-se o espectro de absorvância da amostra (Skoog *et al.*, 1999).



**Figura 1.7 -Esquema simplificado do interferómetro de Michelson e do princípio de operação do espectrofotómetro FT-IR (Espectroscopia de infravermelho com Transformadas de Fourier) (Manual – WineScan FT120, Foss, 2000).**

A utilização de espectrofotômetros com Transformadas de Fourier permite obter maior precisão na medição, melhor relação sinal/ruído, além de apresentar maior facilidade e agilidade na aquisição dos dados da amostra (Skoog *et al.*, 1999).

### **1.3.3 Aplicação da espectroscopia de infravermelho no controlo de qualidade alimentar**

O desenvolvimento da espectroscopia na região do infravermelho surge associado ao algoritmo da Transformada de Fourier e à evolução de técnicas quimiométricas, que emergiram com advento dos microprocessadores digitais e de técnicas computacionais avançadas, permitindo a análise de misturas complexas, como por exemplo, medicamentos e alimentos, entre outros. Na última década a espectroscopia de infravermelho por Transformadas de Fourier (FT-IR) tem afirmado o seu enorme potencial na análise química de amostras biológicas, com especial utilidade para a indústria agro-alimentar e farmacêutica, com o propósito de garantir a autenticidade a qualidade e as características de um determinado produto.

A introdução de instrumentos de FT-IR gerou uma verdadeira revolução na espectroscopia de infravermelho, devido às grandes vantagens que fornecem ao seu utilizador, pois permitem a determinação automatizada dos parâmetros de maior importância na caracterização e diferenciação de diversos produtos, como por exemplo óleos alimentares, vinagres, farinha de trigo, essências alimentares (baunilha, caramelo, cereja, morango e leite), várias espécies de peixes, bebidas alcoólicas, ... (Baeten *et al.*, 2000; Ferrão *et al.*, 2004; Saiz-Abajo *et al.*, 2004a; Saiz-Abajo *et al.*, 2004b; Cozzolino *et al.*, 2005; Uddin *et al.*, 2005; Helfer *et al.*, 2006).

O trabalho de Souza *et al.*, (2006) revelou as potencialidades de técnica DRIFTS (espectroscopia por reflectância difusa no infravermelho médio com Transformadas de Fourier) combinada com a quimiometria no controlo de qualidade de medicamentos que contêm o fármaco dicofenaco de potássio (Souza *et al.*, 2006).

Os trabalhos realizados por Downey (2003) evidenciaram as potencialidades da espectroscopia do visível (400-700 nm) e da espectroscopia de infravermelho na região espectral entre 1100-2498 nm, para a autentificação e classificação de 65 azeites virgem extra, com origem geográfica diferente (Downey *et al.*, 2003).

A aplicação das técnicas espectroscópicas FT-IR, FT-NIR (espectroscopia de infravermelho próximo com Transformadas de Fourier) e FT-Raman (espectroscopia de Raman com Transformadas de Fourier) revelaram grandes vantagens, em termos do menor tempo de análise e da maior facilidade de execução. Na análise discriminante de óleos comestíveis e de gorduras (Yang *et al.*, 2005), de açúcares em sumos de fruta (Rodriguez-Saona *et al.*, 2006). Na classificação do queijo de Cheddar com base no seu sabor, a espectroscopia de infravermelho com Transformada de Fourier permitiu fazer a caracterização e discriminação das amostras, com fundamento nas zonas de absorção dos grupos funcionais (ácidos orgânicos, ácidos gordos e ésteres) compreendida entre 1500-900  $\text{cm}^{-1}$ , pois são estes compostos orgânicos que contribuem de forma significativa para o sabor do queijo (Subramanian *et al.*, 2004). O trabalho de Rodriguez-Saona *et al.*, (2006) comprovou as potencialidades da técnica FT-IR aliada ao ATR (reflectância total atenuada) na determinação da composição química do queijo. A técnica FT-IR combinada com os métodos de calibração PLS (regressão parcial em mínimos quadrados) revelou-se também útil na determinação dos parâmetros de qualidade de gasolinas (Santos *et al.*, 2007).

A metodologia de FT-IR associada ao ATR permitiu quantificar açúcares (glucose, frutose e sacarose) no sumo de manga (Duarte *et al.*, 2002). Estudos mais recentes nesta área evidenciaram os bons resultados desta técnica na determinação de açúcares, como a glucose, a frutose e a sacarose e de ácidos, como o ácido cítrico, o ácido málico, o ácido tartárico, o ácido furânico e o ácido succínico no tomate (Beullens *et al.*, 2006). E na discriminação e caracterização de várias amostras de mel com origem mono floral e poli floral (Ruoff *et al.*, 2006).

A metodologia de FT-IR foi usada como uma ferramenta de monitorização, para quantificar a concentração de ácidos e de açúcares, e detectar a presença de aditivos no sumo de maçã. A técnica FT-IR-PAS (espectroscopia de infravermelho-fotoacústica) permitiu detectar a presença de bactérias e de fungos na superfície da maçã (Veraverbeke *et al.*, 2005). Com o recurso da técnica NIR combinada com análise multivariada, foi possível fazer a discriminação entre várias amostras de café torrado, com diferentes origens e variedades (café arábica e robusta) (Esteban-Díez *et al.*, 2004); e diferentes amostras de chá (Young *et al.*, 2007).

O NIR quando combinado com o método de calibração PLS, demonstra ser uma técnica rápida, de fácil execução na determinação do teor de açúcar total em amostras de café cru (Morgado *et al.*, 2007).

Nas últimas décadas, as técnicas espectroscópicas na região do infravermelho aliada às técnicas quimiométricas têm apresentado resultados muito satisfatórios quando aplicadas no sector vitivinícola, passando a ser prática corrente nos laboratórios de enologia. Desde 1999, que se utiliza a técnica espectroscópica de infravermelho com Transformadas de Fourier, para análise de rotina, a mostos e a vários tipos de vinhos, realizada nos laboratórios de enologia franceses (Bouvier, 2001). De acordo com as potencialidades FT-IR, em 2000 esta metodologia passou a ser uso corrente ao longo da vindima, de forma a acompanhar evolução qualitativa das uvas (Dubernet *et al.*, 2000; Rousseau *et al.*, 2002). O teor em compostos fenólicos foi usado para classificar amostras de vinhos tintos com base no período de envelhecimento (Gómez-Plaza *et al.*, 1999). Os estudos de Watts *et al.*, (2003), apoiam estes resultados, de tal modo que o seu trabalho permitiu obter uma correlação entre os compostos voláteis e o período de envelhecimento de 17 amostras comerciais de Cognac através do recurso a modelos de PLS.

Num estudo publicado em 2002, há referência a aplicação do FT-IR, como complemento ao HPLC na determinação de açúcares, de álcoois e de ácidos orgânicos, em amostras de vinho tinto. Este trabalho demonstra, também que diferentes vinhos, diferentes sistemas de destilação e diferentes períodos de envelhecimento predeterminam diferenças na composição química do produto final, que foram identificadas por FT-IR combinado com a análise multivariada (Palma *et al.*, 2002).

As técnicas espectroscópicas de infravermelho médio bem como, a espectrofotometria no visível foram utilizadas para diferenciar várias amostras de vinhos brancos australianos monocasta em função da casta. Estes modelos foram elaborados recorrendo às técnicas de análise multivariada, análise em componentes principais (PCA), regressão em componentes principais (PCR) e regressão discriminante em mínimos quadrados parciais (DPLS) (Cozzolino *et al.*, 2003).

O FT-IR foi usado também para classificar amostras de turfa com origem geográfica diferentes, que são utilizadas na elaboração do uísque Escocês (Harrison *et al.*, 2004), de modo a promover o controlo de qualidade do produto. O FT-IR revelou, também resultados positivos no estudo de caracterização e autenticação de cervejas e bebidas espirituosas

quando comparados com os da ressonância magnética nuclear de alta resolução (NMR) (Lachenmeier *et al.*, 2007). As técnicas espectroscópicas na região de infravermelho com Transformadas de Fourier e a cromatografia iônica (IC) permitem identificar a existência de falsificações e adulteração na bebida alcoólica Tequila (Lachenmeier *et al.*, 2005).

Pontes *et al.*, em (2005) demonstrou a aplicabilidade e funcionalidade da técnica NIR combinada com métodos quimiométricos para classificar e verificar adulterações em 69 amostras de bebidas alcoólicas (uísques, brandies, rum e vodka) (Pontes *et al.*, 2005).

As técnicas espectroscópicas de infravermelho com Transformadas de Fourier permitem dosar o carbamato de etilo e o ácido hidrocianico, em bebidas alcoólicas obtidas na fermentação de alguns frutos (cereja, alperce e ameixa). Este método revelou vantagens em termos de tempo de análise, de volume de amostra utilizada, quando comparado com método oficial (Abreu *et al.*, 2005; Lachenmeier, 2005).

Os resultados do estudo desenvolvido por Cocciardi *et al.*, (2005) demonstram as potencialidades da espectroscopia FT-IR/ATR para análise de rotina em licores e vinhos.

De forma a controlar e garantir a autenticidade de uma bebida alcoólica, foram realizados estudos, que demonstram as potencialidades da espectroscopia de infravermelho com Transformadas de Fourier combinada com a análise multivariada na caracterização do Cognac e a sua distinção entre outras bebidas destiladas, como por exemplo uísque, rum, brandies e armagnacs (Picque *et al.*, 2006). A aplicação desta técnica de espectroscopia revela-se vantajosa, permitindo a análise quantitativa para uma grande variedade de produtos de origem vínica com utilização da técnica de PLS (Bevin *et al.*, 2006).

O trabalho desenvolvido por Nagarajan (2006) evidenciou a fiabilidade da técnica MIR-ATR para a quantificação de etanol, de sacarose e de ácido tartárico em bebidas alcoólicas, através do desenvolvimento de modelos de calibração e previsão com base na PLS a partir de amostras preparadas em laboratório (Nagarajan *et al.*, 2006).

A aplicação da espectroscopia NIR e da espectrofotometria visível aliada à análise multivariada demonstram resultados ótimos na classificação e diferenciação de amostras comerciais de vinhos da casta Tempranillo de origem espanhola e australiana (Liu *et al.*, 2006)

O trabalho publicado pelo grupo de Haiyan Yu, em 2006, revelou-se decisivo, na medida em que recorrendo a técnica de espectroscopia de infravermelho próximo aliada a análise multivariada PLS, validada com o auxílio da técnica de análise corrente

(espectrofotometria de absorção atômica para o potássio, mercúrio, zinco e ferro), foi possível distinguir as amostras de destilado de arroz com proveniências distintas (Shaoxing, Jiashan, Zhejiang, China). Destacou-se no trabalho, a compatibilidade dos resultados obtidos pelas duas técnicas de análise na caracterização e diferenciação do destilado de arroz de duas regiões, a de Shaoxing (denominação de origem) e a de Jiashan (Yu *et al.*, 2006).

## 1.4 Quimiometria

Os espectros obtidos por FT-IR podem proporcionar valores quantitativos dos componentes de uma amostra. No entanto, essa informação química necessita de ser ajustada a modelos matemáticos, que são obtidos por aplicação de técnicas multivariadas. Entre os diversos métodos de calibração multivariada encontram-se, por exemplo, o MLR (“*Multiple Linear Regression*”), o PCR (“*Principal Components Regression*”), PCA (“*Principal Components Analysis*”) e o PLS (“*Partial Least Squares*”).

### 1.4.1 Alguns conceitos de estatística

Em muitos casos, o que pretendemos analisar como variável dependente, pode ser influenciada por mais que uma variável independente. Quando assim acontece, temos que recorrer a técnicas denominadas por regressão multivariada. Na regressão multivariada, regra geral, o procedimento é análogo à regressão linear simples. No entanto, existem duas diferenças notórias entre a regressão linear simples e a regressão multivariada (Downing *et al.*, 1999):

- não se pode traçar um gráfico da relação, se estiverem presentes mais que duas variáveis independentes;
- o processo de cálculo é mais moroso para a regressão multivariada, donde temos que recorrer a análise computacional;
- na regressão multivariada a análise aos interferentes, tem o objectivo principal de identificar valores discrepantes;

- na regressão multivariada, existem uma série de métodos de diagnóstico, que permitem avaliar a relação entre os conjuntos de dados, como os coeficientes de regressão, morfologia dos vectores de regressão, PRESS (erros de previsão), etc.;
- o coeficiente de correlação linear ( $r$ ) determina a grandeza da correlação linear entre as variáveis designadas por  $x$  e  $y$  para um determinado número de amostras. O seu valor pode variar entre menos um e um, revelando uma melhor correlação se estiver mais próximo do valor um ou menos um.
- o coeficiente de determinação ( $r^2$ ) estima a proporção de  $y$  explicado por  $x$ . O seu valor está limitado entre zero e um. É definido por  $r^2$ , uma vez que representa o quadrado do coeficiente de correlação entre duas variáveis (Downing *et al.*, 1999).

No caso univariado a notação é  $r$  e  $r^2$  para definir respectivamente o coeficiente de correlação linear e o coeficiente de determinação, no caso multivariado usam-se maiúsculas ( $R$  e  $R^2$ , respectivamente).

### 1.4.2 Regressão linear simples

Um dos recursos mais conhecidos em ciências exactas consiste na aplicação de modelos matemáticos a dados experimentais. O caso mais comum é a regressão linear simples ou não, para uma única ou para várias variáveis independentes.

Quando se pretende analisar a correlação entre dois conjuntos de dados, onde há uma variável dependente (ou resposta) com base em valores de pelo menos uma variável independente (ou explicativa), pode-se utilizar a técnica estatística conhecida como regressão simples, que pode ser traduzida pela seguinte representação gráfica (figura 1.8):

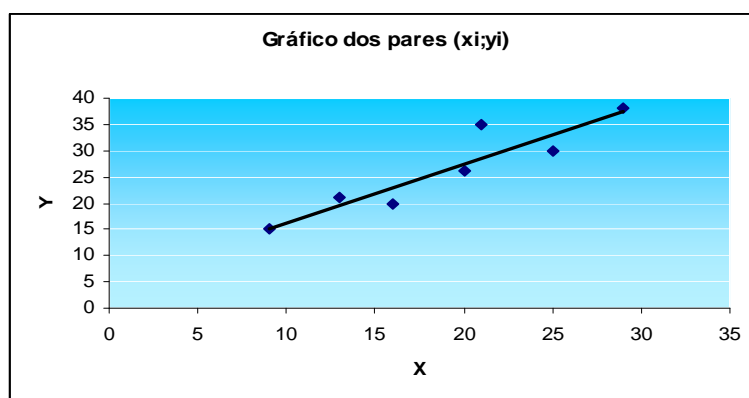


Figura 1.8 -Gráfico de pares (xi; yi).



O modelo de regressão linear de uma amostragem é formalmente representado, pela equação:

$$y_i = b_0 + b_1 x_i \quad (2.5)$$

Em que:

- $y_i$  representa o valor previsto de  $y$  para a observação  $i$  (variável dependente);
- $x_i$  simboliza o valor de  $x$  para a observação  $i$  (variável independente);
- $b_0$  indica o valor da ordenada na origem ( $y$ );
- $b_1$  refere-se ao declive;

### 1.4.3 Princípios básicos sobre a calibração multivariada

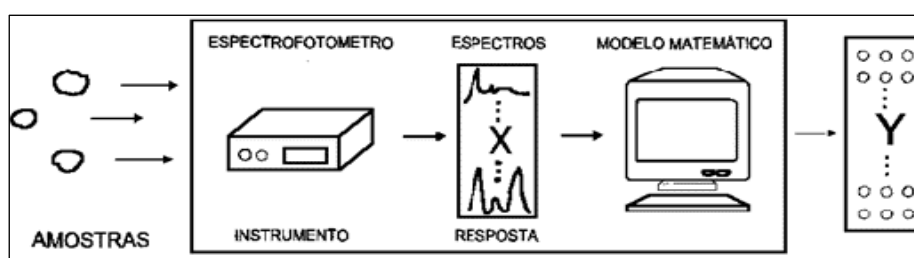
No caso de misturas binárias simples, pode-se obter bons resultados pelo método da curva de calibração, porém é frequente que em amostras reais, possam surgir problemas devido a interferências espectrais e ao não conhecimento da identidade dos compostos químicos que podem ser de interesse para o estudo. Neste caso a simples resolução das equações não nos oferece resultados precisos, pois um dos problemas, é o facto de se tivermos duas ou mais variáveis, as variáveis independentes ( $X$ ) poderem ser colineares; nesse caso recorre-se a métodos multivariados para resolver as equações.

Em 1975 Herman Wold começou a estudar uma outra forma de trabalhar os dados químicos, a quimiometria, que é uma disciplina que engloba métodos de análise estatística, o pensamento matemático e a inteligência artificial, com a finalidade de projectar e seleccionar procedimentos de forma optimizada para uma melhor aquisição de dados químicos, tentando assim retirar o máximo de informação com a análise desse dados. Apesar da sua proximidade com modelos estatísticos, a quimiometria é definida como uma disciplina não da matemática mas da química, isto porque os problemas que se propõe a resolver são de interesse e tem origem na química, ainda que as suas ferramentas de trabalho advenham principalmente da matemática, da estatística e das ciências computacionais.

A calibração multivariada é uma área da quimiometria, que nasceu com o avanço computacional e instrumental, que permitem fazer a ligação entre os sinais dos instrumentos analíticos e os computadores, e a análise de um vasto número de informação, o que até então era impensável por métodos tradicionais.

A calibração multivariada é utilizada de forma bastante efectiva nos casos em que existe o problema de sobreposição de sinais analíticos, devido à existência de interferências espectrais. A calibração multivariada tem como finalidade construir um modelo matemático que relacione a informação obtida por um dado instrumento analítico com alguma(s) propriedade(s) de interesse das respectivas amostras. A partir do modelo construído torna-se então possível a quantificação dessa propriedade em amostras novas. O modelo utiliza toda a informação disponível, estabelecendo-se uma relação entre o sinal e a propriedade em estudo.

A calibração corresponde à aplicação de um tratamento matemático com o intuito de identificar e relacionar a informação disponível (valores espectrais) com um parâmetro físico-químico em estudo (como por exemplo o título alcoométrico volúmico, etc.). O resultado do fluxo de informação de uma calibração encontra-se exemplificado de forma geral na figura 1.9.



**Figura 1.9-Modelo geral do processo de calibração multivariada (Ferreira *et al.*, 1999).**

Esta análise permite estabelecer uma relação entre o conjunto de dados conhecidos, que são denominados por variáveis independentes, neste caso são os espectros de espectroscopia de infravermelho com Transformadas de Fourier e uma ou mais variáveis dependentes, como são neste casos as características de uma aguardente vínica envelhecida (título alcoométrico volúmico, acidez total, acidez volátil, acidez fixa, extracto seco, A440, índice de Folin-Ciocalteu).

Para evidenciar os aspectos fundamentais da elaboração de qualquer modelo de calibração, podemos considerar como exemplo a análise de uma determinada amostra, por espectroscopia de infravermelho. Esta análise inicia-se com a leitura do sinal na região do infravermelho, envolvendo um determinado número ( $m$ ) de valores de números de onda para amostras conhecidas, desta forma estamos a construir uma matriz de dados (figura 1.10). Nesta matriz, designada por  $\mathbf{X}$ , cada coluna corresponde a um número de onda

específico do espectro analisado e cada linha representa cada amostra analisada, que deverá estar caracterizada sobre o ponto de vista físico-químico.

$$X = \begin{bmatrix} x_{11} & \dots & x_{1m} \\ \vdots & \ddots & \vdots \\ x_{n1} & \dots & x_{nm} \end{bmatrix}$$

**Figura 1.10-Matriz X utilizada na elaboração do modelo de calibração (linha x coluna).**

Na matriz, identificada por **Y**, serão inseridos os dados relativos aos sete parâmetros físico-químicos em estudo (título alcoométrico volúmico, acidez total, acidez volátil, acidez fixa, extracto seco, A440; índice de Folin-Ciocalteu), de modo que cada linha destas novas matrizes correspondem a uma amostra diferente e a coluna vai representar um dos vários parâmetros físico-químicos (figura 1.11).

$$Y = \begin{bmatrix} y_{11} & \dots & y_{1p} \\ \vdots & \ddots & \vdots \\ y_{n1} & \dots & y_{np} \end{bmatrix}$$

**Figura 1.11-Matriz Y utilizada na construção do modelo de calibração (linha x coluna).**

Estes dois grupos de informação química, digitalizados e organizados sobre a forma de matrizes constituem o conjunto de calibração e serão analisados para traçar o modelo, recorrendo ao método de calibração seleccionado. Pode haver a necessidade de pré-processar os dados do conjunto de calibração com a finalidade de otimizar o modelo criado. Este tratamento inicial é por vezes necessário tanto, na matriz dos valores instrumentais como nos valores de referência. Quando se recorre a um pré-processamento da informação durante a calibração, este deverá ser utilizado sempre que forem feitas previsões.

Como existem diversos métodos para obter uma calibração multivariada, devemos sempre considerar as suas especificidades e características quando a desejamos utilizar, logo, o delineamento de uma calibração deve usar o método que melhor se ajuste ao sistema de dados em estudo.

Os métodos de calibração multivariada utilizados com maior frequência são o MLR, o PCR, o PLS devido à sua relativa simplicidade e aplicabilidade em diversos tipos de análises e amostras complexas (Souza *et al.*, 2001; Scarminio *et al.*; 1998).

### 1.4.4 Análise em Componentes Principais (PCA)

A análise em componentes principais (PCA) é um método de análise multivariada, que permite projectar o espaço original das variáveis num espaço de dimensão mais reduzida. O cálculo das componentes principais (PCs) é realizado por combinações lineares das variáveis originais.

O PCA é um método de análise exploratória que permite extrair as principais fontes de variabilidade de um conjunto de dados, e possibilita obter uma partição da variância em componentes principais, dado que cada componente principal é calculado com a finalidade de reter a maior quantidade de variância presente nas variáveis originais.

Na análise em componentes principais, os “scores” proporcionam o estudo das relações entre as amostras, traduzem-se na combinação linear das variáveis originais, enquanto que os “loadings” fornecem a relação no espaço das variáveis. Como as PCs são ortogonais, é possível verificar as relações entre as amostras e as variáveis através da representação gráfica dos “scores” e dos “loadings”. A combinação do conjunto de “scores” e “loadings”, permite estimar a influência de cada variável na amostra.

A análise dos “loadings” permite estudar, também as variáveis mais importantes, isto é, a selecção de variáveis em modelos posteriores.

Em suma, um conjunto de dados organizado sobre a forma de uma matriz bidimensional, designada por  $\mathbf{X}_{(n \times m)}$ , em que  $n$  representa o número de amostras e  $m$  corresponde ao número de variáveis, é decomposta na multiplicação de duas matrizes,  $\mathbf{T}_{(n,k)}$  e  $\mathbf{P}_{(k,m)}$ , que representam respectivamente os “scores” e os “loadings” (Massart *et al.*, 1988; Beebe, 1987; Beebe *et al.*, 1998; Martens *et al.*, 1991).

A representação matricial do modelo é dada pela equação 2.6:

$$\mathbf{X}_{(n,m)} = \mathbf{T}_{(n,k)} \mathbf{P}_{(k,m)} + \mathbf{E}_{(n,m)} \quad (2.6)$$

Na equação 2.6, a matriz  $\mathbf{E}_{(n,m)}$  representa a informação não modelada (matriz de erro). A informação não modelada, reunida na matriz erro ( $\mathbf{E}$ ) é tanto menor quanto maior o número de componentes principais usados no modelo. A primeira componente principal é calculada de forma a reter a maior quantidade possível de variância, a segunda é calculada da mesma forma tendo sido retirada aos dados originais a variância já contabilizada pela

primeira componente e assim sucessivamente até serem obtidos tantos componentes principais quantas as variáveis originais. As primeiras componentes principais retêm a maior parte da variância e factores como ruído (informação não modelada) ou correlação são descritos pelos restantes componentes.

#### 1.4.5 Regressão parcial em mínimos quadrados (PLS)

A regressão parcial em mínimos quadrados é utilizada com o intuito de estabelecer uma relação matemática (função) entre os resultados químicos de referência e os sinais espectrais para um determinado parâmetro em estudo.

O método consiste na decomposição da matriz de dados  $\mathbf{X}$ , em termos da soma das várias matrizes  $\mathbf{M}$ ; (que apresentam dimensão igual a um), e da matriz de interferentes (que representa a parte da informação química não modelada), conforme a equação 2.7 (Konzen *et al.*, 2003):

$$\mathbf{X} = \mathbf{M1} + \mathbf{M2} + \dots + \mathbf{Ma} + \mathbf{E} \quad (2.7)$$

Em que  $\alpha$  corresponde ao número de variáveis latentes (componentes principais ou factores), e  $\mathbf{E}$  a informação não modelada (matriz de erro).

As próprias matrizes  $\mathbf{M}$  constituem as chamadas variáveis latentes e são o resultado da multiplicação de dois vectores  $\mathbf{t}$  (scores – coordenadas factoriais) e  $\mathbf{p}$  (loadings – contribuições factoriais) conforme a equação 2.8, refere que:

$$\mathbf{X} = \mathbf{t1p1^t} + \mathbf{t2p2^t} + \dots + \mathbf{tap\alpha^t} + \mathbf{E} \quad (2.8)$$

ou

$$\mathbf{X} = \mathbf{TP^t} + \mathbf{E}$$

A matriz  $\mathbf{Y}$  é decomposta de forma análoga, sendo resultado da soma do produto de “scores” e “loadings” com a matriz de interferentes. A relação de  $\mathbf{X}$  e  $\mathbf{Y}$  será obtida relacionando os *scores* de cada conjunto de dados químicos através de uma relação interna. O método PLS pode ser dividido em PLS1 e PLS2. No caso de termos PLS1, a matriz  $\mathbf{Y}$  adquire a forma de um vector - o vector  $\mathbf{y}$  é constituído por única coluna:

$$\mathbf{y(n,1)} = \mathbf{X(n,m)b(m,1)} + \mathbf{E(n,1)} \quad (2.9)$$

O vector **b** é definido pela equação 2.10:

$$\mathbf{b}(m, 1) = \mathbf{W}(m, k) [\mathbf{P}^T(k, m) \mathbf{W}(m, k)^{-1}] \mathbf{q}^T(k, 1) \quad (2.10)$$

Onde:

- $n$  representa o número de objectos (ou amostras);
- $m$  corresponde ao número de variáveis (descritores);
- $k$  indica o número de variáveis latentes;
- **W** exprime os “loadings weights” (contribuições factoriais ponderadas);
- **P** representa os “loadings” (contribuições factoriais) do domínio **X**;
- **q** designa os “loadings” (contribuições factoriais) associados ao vector **y**.

A vantagem deste método comparativamente ao PCR (regressão por componentes principais) está no facto de que o PCR não considera a informação em **y** para modelar a informação presente em **X**. O PLS modela ao mesmo tempo as relações entre **X** e **Y** (ao contrário do PCR), por intermédio de uma relação interna. É de extrema importância neste modelo de calibração e previsão o número de variáveis latentes necessárias à descrição satisfatória da variabilidade do sistema.

#### 1.4.6 Validação do modelo de calibração

Após a construção do modelo de calibração é necessário avaliar a sua capacidade de prever. Isto é, temos que estimar a sua robustez. As duas estratégias básicas de validação do modelo são a validação externa, em que são introduzidos novos dados para testar a capacidade de prever do modelo, e a validação interna, em que um conjunto de dados originais da calibração é também utilizado como conjunto de validação, (Swierenga, 1999). A validação externa é aconselhável por utilizar amostras que não pertencem ao conjunto inicial de calibração, no entanto, caso não existam amostras disponíveis, a metodologia de validação cruzada pode ser utilizada como uma estratégia de validação interna, em que é feita uma selecção de subconjuntos provenientes do conjunto de calibração que serão usados no cálculo do modelo.

Durante este processo de validação, temos que considerar dois factores:

- o número de variáveis latentes a ser utilizado no modelo;
- a detecção de amostras atípicas.

### 1.4.7 Selecção do número de variáveis latentes

É necessário definir com precisão o número de variáveis latentes (LV), uma vez que, se usarmos um número inferior de LV estamos a subestimar (*under-fitting*) o modelo, o que implica que existe informação importante para o modelo, que não é modelada. Se pelo contrário, tivermos um número superior de LV, estamos a sobrestimar (*over-fitting*) o modelo, pois introduzimos ruído no modelo de calibração e previsão. A determinação do número de variáveis latentes utilizadas no modelo de calibração e previsão pode ser realizada de duas formas distintas:

- LOOCV (*leave-one-out cross validation*) em que se retira apenas um objecto de **y** e **X** de cada vez;
- LKOCV (*leave-k-out cross validation*) em que se retiram k objectos de **y** e **X** de cada vez (Baumann, 2003).

Para cada interacção de LOOCV e LKOCV são obtidas diferenças entre os valores previstos e os observados em **y**, esta diferença é traduzida pelo somatório do quadrado dos erros de previsão (equação 2.11) – *PRESS*

$$PRESS = \sum (y_i' - y_i)^2 \quad (2.11)$$

Em que:

- $y_i$  simboliza o valor de referência;
- $y_i'$  representa o valor estimado pelo modelo (calculado pelo modelo) com k variáveis latentes.

Quando se faz a representação gráfica dos valores de *PRESS* em função de k, o valor mínimo normalmente indica o número óptimo de variáveis latentes que devem ser utilizadas.

As amostras do conjunto de calibração podem ser utilizadas para analisar a capacidade de previsão do modelo. O desempenho do modelo é avaliado pelo cálculo do erro médio de previsão - *MSEPcv* (“*mean square error of prediction*”), dado pela equação 2.12:

$$MSEPcv = \left[ \frac{\sum (y_i' - y_i)^2}{n} \right] \quad (2.12)$$

Para avaliar comparativamente diferentes modelos, recorreremos ao cálculo da raiz quadrada do erro médio de previsão (*RMSECV*), esta grandeza é calculada pela equação 2.13, é um indicador do desempenho do método,

$$RMSECV = \sqrt{\left[ \frac{\sum (y_i - \hat{y}_i)^2}{n-k-1} \right]} \quad (2.13)$$

Como podemos quantificar o valor do erro de previsão tanto para um conjunto de calibração, submetido a validação interna ou validação externa, é usual fazer a sua distinção, escrevendo no final da sigla *RMSE* as letras C, e P respectivamente.



## 2. Objectivos

Este trabalho experimental teve como objectivo estudar a possibilidade da conjugação da espectroscopia de Infravermelho com Transformadas de Fourier (FT-IR) com a análise multivariada para a caracterização de aguardentes vínicas envelhecidas.

Pretende-se com a realização deste trabalho desenvolver um modelo de calibração, com base na informação obtida através da metodologia em estudo (espectroscopia de infravermelho (vertente FT-IR) e na informação química de referência, que permita caracterizar sob ponto de vista físico-químico as aguardentes vínicas envelhecidas em estudo de forma adequada e rápida, para os vários parâmetros analíticos de interesse: título alcoométrico volúmico, acidez total, acidez volátil, acidez fixa, extracto seco, A440; índice de Folin-Ciocalteu.

Neste sentido e a partir dos espectros obtidos na região do infravermelho próximo e médio de amostras de aguardentes vínica envelhecida, pretende-se construir modelos de calibração/previsão, tendo como principal foco deste trabalho o uso do método de regressão PLS1 (regressão parcial em mínimos quadrados).

A realização do trabalho visa estudar o contributo das potencialidades da Espectroscopia de Infravermelho na caracterização célere de aguardentes vínicas envelhecidas e ao mesmo tempo, fazer um estudo comparativo de duas abordagens de análise multivariada, a saber: sistema proposto pelo equipamento WineScan FT120 e o modelo de calibração proposto por um software desenvolvido na Universidade de Aveiro.

### **3. Materiais e Métodos**

Com o objectivo de facultar a compreensão e leitura do trabalho, serão apresentados inicialmente os métodos analíticos comuns para análise de aguardentes vínicas envelhecidas, e só posteriormente será realizada a caracterização das amostras utilizadas e o delineamento experimental.

#### **3.1 Métodos analíticos comuns**

##### **3.1.1 Título alcoométrico volúmico**

O título alcoométrico volúmico (TAV) foi determinado por destilação e areometria, de acordo com o método proposto por Belchior e Carvalho (1984).

##### **3.1.2 Acidez total, acidez fixa e acidez volátil**

O parâmetro analítico acidez total (AcTotal) foi determinado por titulação de uma alíquota de 25 mL de aguardente vínica envelhecida com solução de NaOH 0,1 N, segundo Belchior e Carvalho (1984). A acidez fixa (AcFixa) das aguardentes foi determinada por titulometria das substâncias ácidas contidas no extracto seco, conforme metodologia descrita em Belchior e Carvalho (1984).

A acidez volátil (AcVol) das aguardentes vínicas envelhecidas foi determinada por diferença entre o valor da acidez total e o valor da acidez fixa.

##### **3.1.3 Extracto seco**

O extracto seco (ESeco) foi determinado por gravimetria, após evaporação de 25 mL da aguardente vínica envelhecida a 100°C até à secura, de acordo com o método usual da OIV (1994).

##### **3.1.4 Intensidade da cor – A440 nm**

A intensidade da cor baseou-se na leitura da absorvância a 440 nm (Belchior e Carvalho, 1983). As determinações espectrofotométricas foram efectuadas no

espectrofotómetro de Ultravioleta/Visível, Cary Bio 100, utilizando células de quartzo de 10 mm.



**Figura 3.1-Fotografia do espectrofotómetro Ultravioleta/Visível.**

### **3.1.5 Polifenóis totais**

Os polifenóis totais foram determinados através do Índice de polifenóis totais (Ipt), resultado do produto do valor da absorvância a 280 nm pelo factor de diluição (Ribéreau-Gayon, 1970). O Índice de Folin-Ciocalteu (IFC), também permite avaliar o teor em compostos polifenóis totais. É determinado por colorimetria, baseado na leitura da absorvância a 760 nm, de acordo com a metodologia de Singleton e Rossi (1965) e Brun (1979).

## **3.2 Obtenção dos espectros de infravermelho das aguardentes vínicas envelhecidas**

### **3.2.1 Equipamento WineScan FT120**

O equipamento utilizado foi o espectrómetro WineScan FT120 fabricado pela Foss (figura 3.2), equipado com um detector piroeléctrico DTU. As medições foram realizadas através do fluxo criado pela amostra nas células equipadas com duas “janelas” de  $\text{CaF}_2$ . Cada célula (ou *cuvette*) tem 10 mm de diâmetro e 2 mm de espessura, com abertura óptica de  $88,54 \text{ mm}^2$  e volume de  $3,276 \mu\text{L}$ . O percurso óptico é de  $37 \mu\text{m}$ . Para minimizar os fenómenos de reflexão interna as células estão dispostas de uma forma antiparalela. O interferograma possui um laser de HeNe (632 nm) e um

detector de silício que acompanha o movimento do espelho móvel (Patz *et al.*, 2004; Moreira *et al.*, 2005).

As amostras de aguardente vínica envelhecida não foram submetidas a nenhum tratamento prévio. Por acção de um amostrador automático as amostras são introduzidas no aparelho, sendo termostatizadas a 40°C antes de se iniciar a análise.



Figura 3.2-Fotografia do aparelho - WineScan FT120.

### 3.3 Construção dos modelo de calibração multivariada

A realização deste trabalho teve como base o *ensaio realizado no âmbito do Projecto PAMAF – 2052 – Estudo integrado de madeiras, tecnologias de tanoaria e de produção de aguardentes velhas de qualidade, com apoio à denominação “Lourinhã”*.

Um dos objectivos principais do trabalho têm por base o desenvolvimento de um modelo de regressão parcial em mínimos quadrados (PLS1) para cada um dos parâmetros físico-químicos em estudo: título alcoométrico volúmico, acidez total, acidez fixa, acidez volátil, intensidade de cor a 440 nm, extracto seco e índice de Folin-Ciocalteu, com base na informação obtida através da metodologia em estudo (espectros de FT-IR) e na informação físico-química de referência, que permite caracterizar as aguardentes vínicas envelhecidas em estudo de forma adequada e rápida.

As características físico-químicas gerais das amostras utilizadas foram determinadas de acordo com os métodos oficiais (ver capítulo 3.1), no Laboratório da ex-Estação Vitivinícola Nacional em Dois-Portos. A relação estabelecida entre este vasto conjunto de informação química (informação espectral/informação físico-química de referência) permite avaliar de modo comparativo os espectros de FT-IR de aguardentes vínicas envelhecidas em diferentes condições.

### 3.3.1 Delineamento experimental e amostragens

O ensaio foi delineado como triplo factorial, onde se avaliam três factores, de extrema importância para as aguardentes vínicas envelhecidas em madeira (Tabela 3.1):

- o tipo de madeira;
- a intensidade da queima;
- o tempo de envelhecimento.

Assim foram elaboradas vasilhas de:

- \* carvalho português de três origens geográficas distintas (CNE, CNF, CNG) - *Quercus pyrenaica* Willd.;
- \* castanheiro português (CAST) – *Castanea sativa* Mill.;
- \* carvalho francês da floresta de Allier (CFA) – *Quercus sessiliflora* Salisb.;
- \* carvalho francês da floresta de Limousin (CFL) – *Quercus robur* L.;
- \* carvalho americano (CAM) – mistura de *Quercus alba* L./ *Quercus stellata* Wangenh. e *Quercus lyrata* Walt./ *Quercus bicolor* Wild.

De cada madeira foram elaboradas 9 quartolas, três delas foram submetidas a queima ligeira (QL); três submetidas a queima média (QM) e três submetidas a queima forte (QF) perfazendo um total de 63 vasilhas para este ensaio.



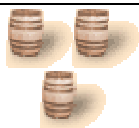


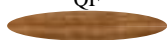








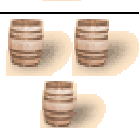














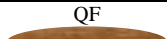



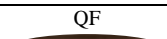



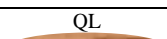
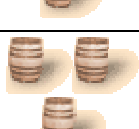


A elaboração das quartolas foi feita de acordo com a técnica europeia, recorrendo a vergadura das aduelas por acção de um fogacho (tempo médio - cerca de 20 minutos), seguida da queima das quartolas também pela acção do calor. O controlo do nível de queima foi realizado empiricamente pela tanoaria, considerando para tal, aspectos como tempo, aspecto e aroma da própria quartola (Caldeira, 2004).






































As 63 vasilhas foram cheias, em 1996, com a mesma aguardente vínica branca da Adega Cooperativa da Lourinhã, produzida por destilação contínua, naquela adega, com 76,9 % v/v de título alcoométrico e com uma acidez total de 0,45 g/dm<sup>3</sup> A.P. (expressa em g de ácido acético/L A.P.).

Estas quartolas foram colocadas na cave da Comissão Vitivinícola Regional da Lourinhã. Foram realizadas duas amostragens das aguardentes em envelhecimento, a primeira ao fim de dois anos de envelhecimento (1998), e a segunda após quatro anos de envelhecimento (2000). As amostras de aguardente vínica envelhecida, objecto do

presente trabalho, foram conservadas em garrafa de vidro verde na cave da ex-Estação Vitivinícola Nacional, desde o ano em que se realizou a sua amostragem.

**Tabela 3.1**-Aguardentes utilizadas no trabalho experimental.

| Espécie botânica   | Identificação das madeiras | Intensidade de queima   | Réplicas de ensaio   | Período de envelhecimento-amostragens   |   |
|--|----------------------------|---|--|---|---|
|  |                            |   |  | 24 meses  | 48 meses  |
| <i>Quercus pyrenaica</i> Willd.<br> | CNE                        | QL<br>   |    |    |    |
|  |                            | QF<br>   |    |    |    |
|  |                            | QF<br>   |   |    |    |
|  | CNF                        | QL<br> |  |  |  |
|  |                            | QF<br> |  |  |  |
|  |                            | QF<br> |  |  |  |
|  | CNG                        | QL<br> |  |  |  |
|  |                            | QF<br> |  |  |  |
|  |                            | QF<br> |  |  |  |
|  | CAST                       | QL<br> |  |  |  |

|  |     |    |  |   |   |
|--|-----|----|--|---|---|
| <br><i>Castanea sativa</i> Mill.  |     | QF |    |    |    |
|  |     | QF |    |    |    |
| <i>Quercus sessiliflora</i> Salisb.<br>   | CFA | QL |    |    |    |
|  |     | QF |    |    |    |
|  |     | QF |    |    |    |
| <i>Quercus robur</i> L.<br>   | CFL | QL |   |   |   |
|  |     | QF |  |  |  |
|  |     | QF |  |  |  |
| <br><i>Quercus alba</i> L./ <i>Quercus stellata</i> Wangenh. e<br><i>Quercus iyrata</i> Walt./ <i>Quercus bicolor</i> Wild. | CAM | QL |  |  |  |
|  |     | QF |  |  |  |
|  |     | QF |  |  |  |

O trabalho experimental realizou-se na ex-Estação Vitivinícola Nacional em Dois-Portos, tendo as 124 amostras de aguardentes analisadas pelas metodologias referidas anteriormente (ver capítulo 3.1).

### 3.3.2 Aquisição dos espectros

Para a obtenção dos espectros de infravermelho foi utilizado o equipamento WineScan FT120 (ver ponto 3.2.1). As condições de aquisição do espectro são as seguintes: temperatura constante de 40°C, intervalo espectral de aquisição dos espectros de FT-IR entre 5012-916  $\text{cm}^{-1}$  (ao qual correspondem 1056 pontos por espectro) que inclui uma pequena secção da região do infravermelho próximo (Nieuwoudt *et al.*, 2004; Lachenmeier *et al.*, 2005), com uma resolução de 4  $\text{cm}^{-1}$ .

Para cada amostra os espectros foram obtidos em quintuplicado, com a duração de aquisição de 2 minutos e 47 segundos, utilizando um volume de amostra de 40 mL.

Os espectros originais já se encontram subtraídos do sinal da água, dado que o software FT120 v2.2.2. elimina automaticamente as zonas espectrais de absorção da molécula de água compreendidas entre 1887-1447  $\text{cm}^{-1}$  e 3696-2971  $\text{cm}^{-1}$  para evitar que o sinal das moléculas de água, sejam incluído nos modelos. A região espectral localizada a partir de 3627  $\text{cm}^{-1}$  foi eliminada por ser considerada pobre em informação útil para a caracterização das amostras (Patz *et al.*, 2004; Moreira *et al.*, 2005). Os espectros obtidos pelo WineScan FT120 apresentam um corte entre 1717 e 1543  $\text{cm}^{-1}$ , que é induzido pelo aparelho.

### 3.3.3 Análise multivariada

#### 3.3.3.1 Calibração

A base dos dados de calibração é constituída com o auxílio do conjunto de espectros de aguardentes vínicas envelhecidas, para os quais se atribuiu um valor de referência para um determinado parâmetro físico-químico TAV, AcTotal, AcFixa; AcVol, A440 nm, ESeco e IFC, obtido por um método de referência.

#### *Software desenvolvido na Universidade de Aveiro*

O software desenvolvido na Universidade de Aveiro faz uso do modelo de análise multivariada - regressão parcial em mínimos quadrados (PLS1) (ver capítulo 1.4) e o utiliza um método de Monte Carlo para validação dos modelos. Para o cálculo dos modelos de calibração foi usada a região 2971-965  $\text{cm}^{-1}$ . Neste trabalho, são objecto de



estudo sete parâmetros físico-químicos, título alcoométrico volúmico, acidez total, acidez fixa, acidez intensidade de cor a 440 nm, extracto seco e índice de Folin-Ciocalteu, de tal modo que temos para cada parâmetro analisados um vector  $y$  que corresponde a [ $n$  objectos x 1 resposta].

### ***Software do WineScan FT120 v.2.2.2***

O software padrão FT120 v2.2.2. (Foss Deutschland, Hamburg, Alemanha), permite a determinação quantitativa dos espectros de FI-TR, através da análise multivariada PLS1 (ver capítulo 1.4) com o auxílio da ferramenta de selecção do filtro automático do software, são escolhidos cerca de 15 a 25 números de onda para cada parâmetro físico-químico analisado, com o objectivo de obter as melhores correlações entre os valores de absorvância observados (valores estimados) e os valores de referência (valores actuais). Com base nos valores de intensidades de absorção para os vários números de onda dos espectros e dos valores de referência foi elaborado um modelo de calibração.

O método PLS estabelece a relação entre os sinais espectrais e os parâmetros físico-químicos. O número óptimo de factores (número de variáveis latentes), é seleccionado com base no valor mais baixo, do erro padrão de validação SECV (cross-validation error) (Moreira *et al.*, 2004; Nieuwoudt *et al.*, 2004; Lachenmeier *et al.*, 2007).

Fazendo uso deste software são objecto de estudo os parâmetros físico-químicos: título alcoométrico volúmico, acidez total, acidez volátil, intensidade de cor a 440 nm, extracto seco e índice de Folin-Ciocalteu.

#### 4. Resultados e Discussão

Com o intuito de facilitar a compreensão e leitura do capítulo 4, no sub-capítulo 4.1 será ilustrada a análise em componentes principais (PCA) dos espectros das amostras de aguardentes vínicas envelhecidas, com o objectivo de as distinguir consoante o período de envelhecimento. No sub-capítulo 4.2 serão apresentados separadamente os modelos de calibração e previsão elaborados a partir de dois conjuntos de software de análise multivariada: 1) software desenvolvido na Universidade de Aveiro e 2) software de análise multivariada do equipamento WineScan FT120 v2.2.2.

No sub-capítulo 4.3 será apresentada a interpretação dos modelos PLS1 para os parâmetros físico-químicos estudados.

Um espectro de infravermelho que se pode considerar ideal é aquele que apresenta o seguinte perfil espectral: uma linha de base plana, nenhuma banda saturada, bandas resolvidas, elevada razão sinal/ruído, ausência de interferências, ausência de bandas de que possam originar artefactos nos modelos, como bandas de absorção das moléculas de água e de dióxido de carbono.

A água, o etanol, os fenóis voláteis, os aldeídos fenólicos, os aldeídos furânicos e muitos outros compostos químicos estão presentes nas aguardentes vínicas envelhecidas, embora sendo diferentes, exibem zonas de absorção semelhantes e sobrepostas, que não podem ser atribuídas a compostos químicos individuais.

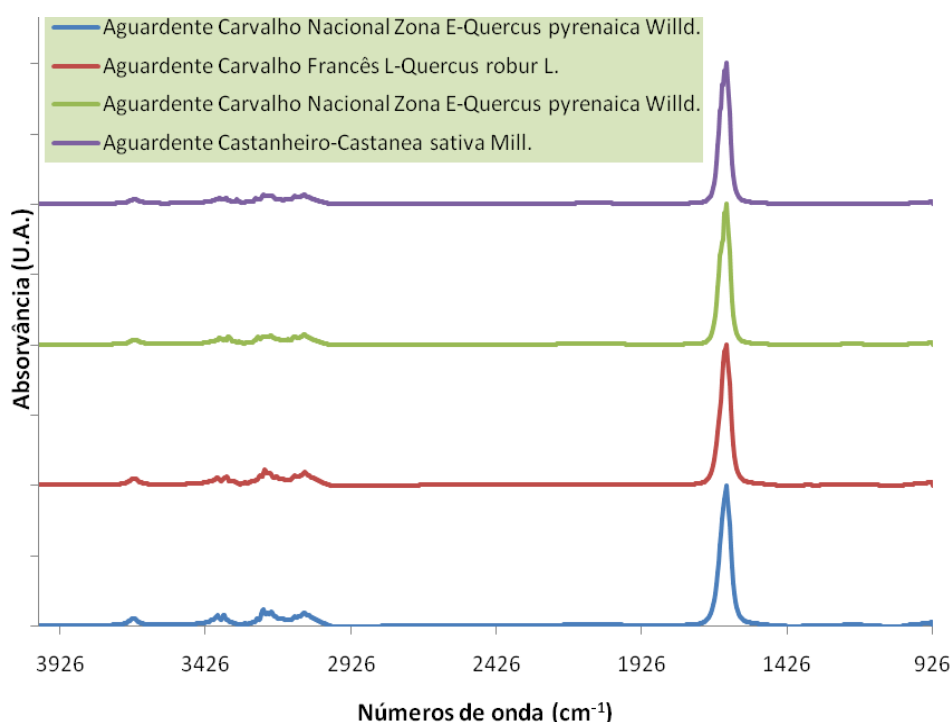
De tal forma que, o conjunto de espectros das aguardentes vínicas envelhecidas, que são objecto de estudo deste trabalho, parece muito homogéneo e semelhante, logo não pode ser interpretado convencionalmente, de tal modo que houve a necessidade de recorrer a técnicas quimiométricas.

Para desenvolver os modelos de regressão PLS1 devemos dispor de uma grande diversidade de amostras, com características físicas e químicas representativas dos objectos de estudo.

Quando desenvolvidos os modelos de calibração e previsão com o auxílio da quimiometria, a espectroscopia de infravermelho com Transformadas de Fourier, revela-se um técnica poderosa para análise quantitativa e qualitativa.

A regressão PLS1 é baseada na relação entre duas matrizes de dados, a matriz **X** (que representa os valores de absorvâncias para diferentes números de ondas) e a matriz **Y** (que ilustra os valores das variáveis físico-químicas: título alcoométrico volúmico, acidez total, acidez volátil, acidez fixa, intensidade da cor a 440 nm, extracto seco e índice de Folin-Ciocalteau).

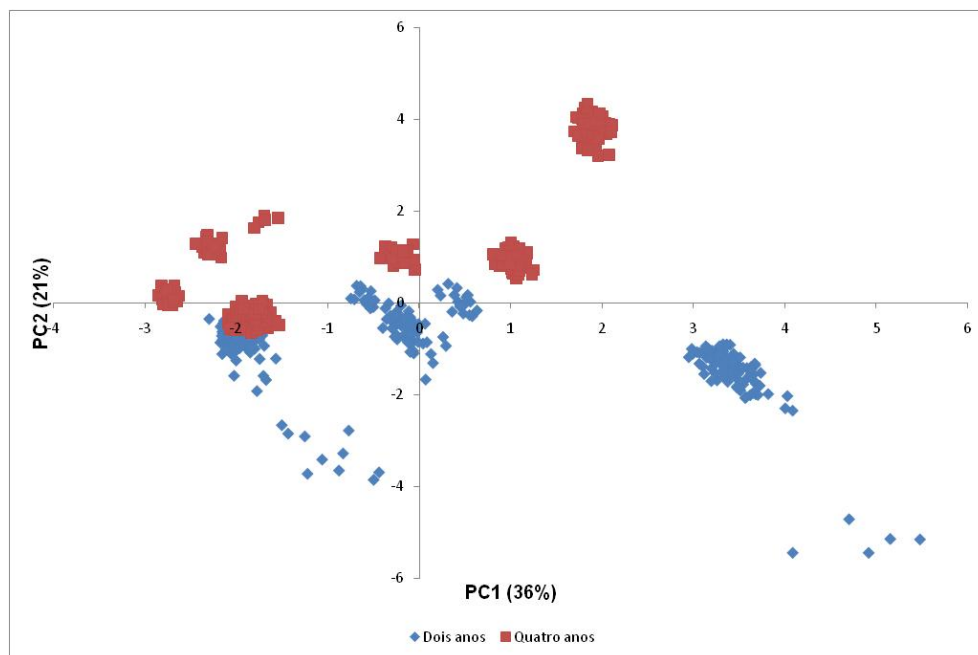
A figura 4.1 apresentam-se os espectros típicos de quatro amostras de aguardentes vínicas envelhecidas, obtidos no WineScan FT120.



**Figura 4.1-Espectros típicos de quatro amostras de aguardentes vínicas envelhecidas obtidos no WineScan FT120.**

#### **4.1 Análise em Componentes Principais dos espectros das aguardentes vínicas envelhecidas.**

Com o objectivo de observar se os espectros traduzem a variabilidade das amostras, relativamente ao período de envelhecimento, foi aplicada uma PCA aos espectros de FT-IR, obtidos para todas as amostras de aguardente vínica envelhecida (figura 4.2).



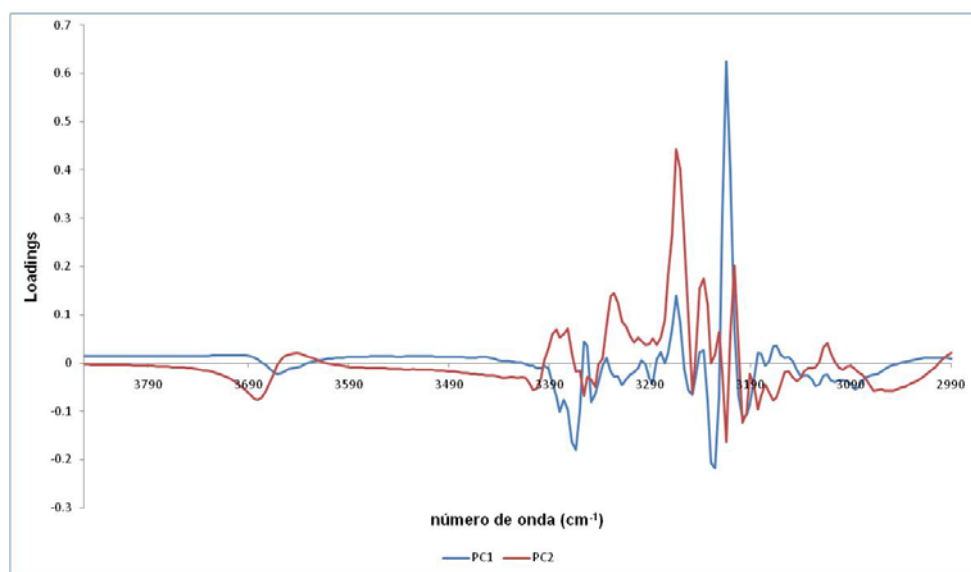
**Figura 4.2. Coordenadas Factoriais (PC1 vs. PC2) dos espectros FT-IR das aguardentes v nicas.**

A PCA mostra que o primeiro componente principal (PC1) explica 36,0% da variabilidade total dos dados amostrais, sendo que o segundo componente principal (PC2) explica 21,0 % da variabilidade total e está relacionado com a diferenciação das aguardentes de acordo com o tempo de estágio em quartola de madeira.

Verifica-se que o eixo PC2 separa as amostras de acordo com o período de envelhecimento (2 e 4 anos). Os resultados mostram que   possível distinguir as amostras de aguardente vínica de acordo com o período de envelhecimento (2 e 4 anos), o que se revela de extrema importância para a sua distinção a nível da qualidade do produto. Resultados concordantes foram obtidos por Palma *et al.*, (2002) com brandies de Jerez. Neste contexto a análise multivariada de resultados espectrais, pode ser considerada como o ponto de partida para um estudo a nível de adulterações e falsificações desta bebida espirituosa e sobre o impacto do período de envelhecimento nas suas características.

De acordo com a figura 4.3 as contribuições factoriais do eixo PC2 que apresentam loadings positivos caracterizam principalmente o envelhecimento da aguardente vínica com quatro anos de estágio em quartola de madeira, enquanto que as contribuições factoriais do eixo PC2, que evidenciam loadings negativos põem em evidência e caracterizam as aguardentes com estágio de 2 anos em quartolas de madeira. As bandas dos espectros de FT-IR que estão relacionadas com o período de estágio das

aguardentes vínicas envelhecidas em quartola de madeira (figura 4.3) são as bandas localizadas a 3390, 3250, 3190, 3125  $\text{cm}^{-1}$ , que correspondem ao PC1 negativo e PC2 positivo (2ºquadrante), a banda a 3080  $\text{cm}^{-1}$ , que corresponde a PC1 positivo e PC2 negativo (4ºquadrante) e as bandas localizadas a 3265 e 3215  $\text{cm}^{-1}$ , que correspondem ao PC1 positivo e PC2 positivo (1ºquadrante), estas bandas estão associadas ao alongamrnto da ligação O-H.



**Figura 4.3. Contribuições factoriais (PC1 e PC2) dos espectros FT-IR das aguardentes vínicas.**

## **4.2 Modelos PLS1 para os parâmetros físico-químicos: TAV, AcTotal, AcVol, AcFixa, ESeco, A440 e IFC**

### *Software desenvolvido na Universidade de Aveiro*

Com vista à construção dos modelos de calibração e previsão, os espectros e os resultados das análises físico-químicas das aguardentes vínicas envelhecidas, (TAV, AcTotal, AcVol, AcFixa, ESeco, A440, IFC) foram submetidas à regressão PLS1 a região espectral compreendida entre 2971 e 926  $\text{cm}^{-1}$ .

Para o efeito, procedeu-se à aquisição dos espectros das 124 amostras de aguardentes vínicas envelhecidas, nas condições descritas no ponto 3.3.3.

Construiu-se uma matriz **X** com 625 linhas, correspondentes às 124 amostras de aguardentes analisadas em quintuplicado e 1059 colunas correspondentes ao intervalo

de números de onda em que foram realizadas as leituras de absorvância (2971-926  $\text{cm}^{-1}$ ). De modo similar construiu-se uma matriz **Y** com 625 linhas, correspondentes às 124 amostras de aguardentes analisadas em quintuplicado e em que as colunas identificam os vários parâmetros analíticos em estudo (TAV, AcTotal, AcVol, AcFixa, ESeco, A440, IFC) determinados por análise de acordo com os métodos oficiais, que se apresentam descritos no capítulo 3.1.

A regressão PLS1 foi utilizada como método de calibração dos parâmetros de interesse; é uma técnica que permite, em amostras complexas, seleccionar somente a variação nos espectros que estão relacionadas com o parâmetro físico-químico a modelar. Cada modelo foi testado por, validação cruzada, utilizando o método Monte Carlo, que pode ser utilizada como uma estratégia de validação interna, deixando de fora cada uma das amostras em cada interacção (LOOCV - leave-one-out cross validation), isto é, todas as suas cinco réplicas do espectro, de tal forma que este conjunto de réplicas é tratado como uma amostra desconhecida.

A Tabela 4.1 ilustra os valores obtidos pelo modelo de PLS1, para os sete parâmetros físico-químicos objecto de estudo (TAV, AcTotal, AcVol, AcFixa, ESeco, A440, IFC), designadamente: número de variáveis latentes (LV), raiz quadrada do erro médio de previsão da calibração-cruzada (RMSECV), coeficiente de determinação da validação-cruzada ( $Q^2$ ) e coeficiente de determinação ( $R^2$ ). Uma das funções objectivo que permite aferir a capacidade de previsão do modelo de calibração para cada parâmetro físico-químicos é designada por raiz quadrada média do erro de validação-cruzada (RMSECV), e que se pode exprimir em percentagem quando normalizado pelo valor da média aritmética do parâmetro em análise.

**Tabela 4.1**-Resumo dos resultados obtidos para os modelos PLS1 (Software desenvolvido na Universidade de Aveiro).

| Parâmetro físico-químico analisado | LV | RMSECV(%) | Q <sup>2</sup> | R <sup>2</sup> |
|------------------------------------|----|-----------|----------------|----------------|
| TAV                                | 2  | 1,80      | 0,94           | 0,94           |
| AcTotal                            | 4  | 7,2       | 0,88           | 0,89           |
| AcFixa                             | 6  | 14,2      | 0,83           | 0,87           |
| AcVol                              | 3  | 13,2      | 0,64           | 0,68           |
| ESeco                              | 6  | 6,4       | 0,97           | 0,98           |
| A440                               | 6  | 9,2       | 0,97           | 0,98           |
| IFC                                | 5  | 11,0      | 0,95           | 0,96           |

Os valores da Tabela 4.1 permitem avaliar as características dos modelos de calibração para cada um dos parâmetros de interesse e, de acordo com o plano experimental, abrangem claramente a avaliação característica de um vasto número de aguardentes vínicas envelhecidas.

#### ***Software WineScan FT120 v.2.2.2.***

A construção dos modelos de calibração para os parâmetros físico-químicos em estrudo, teve como base a relação entre os espectros e os resultados das análises físico-químicas das aguardentes vínica envelhecidas, que foram submetidas à análise multivariada PLS1 na região espectral compreendida entre 2971-926 cm<sup>-1</sup>. As condições de aquisição dos espectros das 124 amostras apresentam-se descritas no ponto 3.3.3.

Os espectros de infravermelho foram analisados pelo módulo fornecido pelo software do aparelho WineScan FT120 v2.2.2. utilizando a técnica de regressão PLS1.

Os modelos de calibração e previsão PLS1, propostos pelo Winescan FT120, para os parâmetros físico-químicos TAV, AcTotal, AcVol, ESeco, A440, IFC, encontram-se na Tabela 4.2, que ilustra a informação relativa aos dados de referência e aos resultados obtidos por análise multivariada PLS1.

Os valores obtidos para cada modelo de PLS1 (TAV, AcTotal, AcVol, ESeco, A440, IFC), nomeadamente: o número de variáveis latentes (LV), o erro de validação cruzada (SECV), o erro de precisão associado a cada modelo (RMSECV) e o coeficiente de determinação (R<sup>2</sup>) evidenciam-se na Tabela 4.2.

**Tabela 4.2-** Resumo dos resultados obtidos para os modelos PLS1 (Software do equipamento Winescan FT120 v.2.2.2.).

| Parâmetro físico-químico analisado | LV | SECV   | RMSECV (%) | R <sup>2</sup> |
|------------------------------------|----|--------|------------|----------------|
| TAV                                | 5  | 0,5594 | 0,79       | 0,93           |
| AcTotal                            | 10 | 0,0543 | 10,9       | 0,61           |
| AcVol                              | 1  | 5,3683 | 418,5      | 0,50           |
| ESeco                              | 12 | 0,0806 | 3,93       | 0,95           |
| A440                               | 7  | 0,0553 | 9,9        | 0,98           |
| IFC                                | 5  | 2,2930 | 13,0       | 0,96           |

O software do equipamento WineScan FT120 v.2.2.2. apenas permite ao utilizador estimar o valor do erro de validação cruzada (SECV) para os modelos de PLS1. O erro de previsão associado a cada modelo (RMSECV), foi calculado pela aplicação da razão  $\left(\frac{SECV}{Medida} \times 100\%\right)$  de acordo com o trabalho de Lachenmeier *et al.* (2005) no estudo de controlo de qualidade de tequilas (Lachenmeier *et al.*, 2005).

O modelo PLS1 construído para o parâmetro físico-químico acidez volátil, evidencia um número de LVs igual a 1, logo estamos a subestimar o modelo, o que significa que existe informação útil, que não é modelada. Este modelo é caracterizado por apresentar um erro de precisão extremamente elevado, o que invalida qualquer utilidade deste modelo.

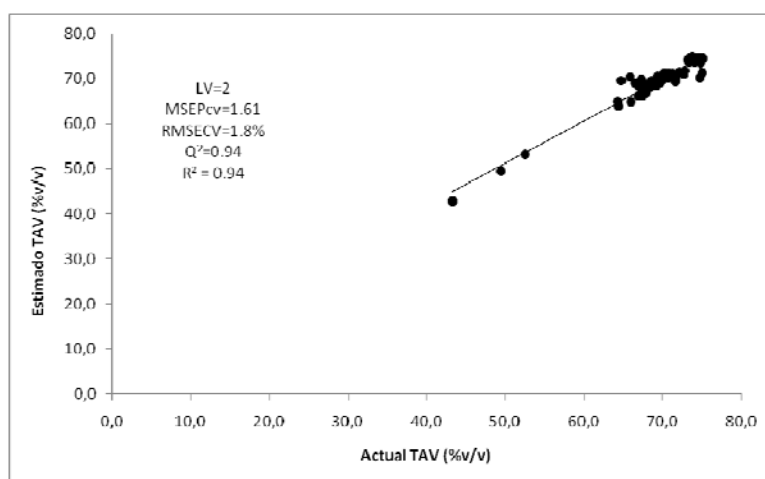
Os restantes modelos PLS1, de acordo com os valores da Tabela 4.2, apresentam um número de variáveis latentes (LVs) superior, em comparação com os observados na Tabela 4.1. O valor mais elevado de variáveis latentes pode sugerir que os modelos fornecidos pelo software do equipamento WineScan FT120 estarão, certamente, sobre-estimados, logo a sua utilização para a previsão destes parâmetros em amostras desconhecidas de aguardentes vínicas, poderá não evidenciar o valor mais correcto para cada parâmetro analítico em estudo neste trabalho, sendo preferível recorrer a utilização dos modelos apresentados na Tabela 4.1, para posterior previsão de cada parâmetro em amostras de aguardentes vínica envelhecida.



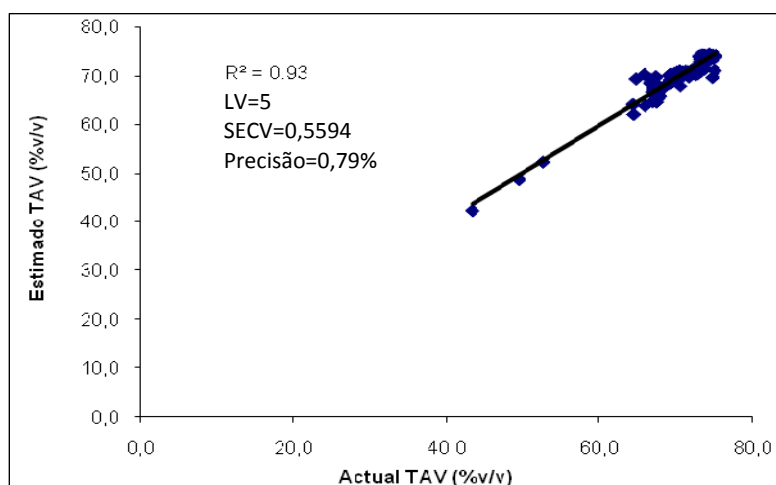
### 4.3 Interpretação dos modelos PLS1 para os parâmetros físico-químicos: TAV, AcTotal, AcVol, AcFixa, ESeco, A440 e IFC

Com o objectivo de quantificar o título alcoométrico volúmico, a acidez total, a acidez volátil, a acidez fixa, a intensidade da cor a A440 nm, o extracto seco e o índice de Folin-Ciocalteu presentes em novas amostras de aguardente vínica envelhecida, foi aplicada a regressão PLS1 aos espectros de FT-IR, de todas fracções de aguardentes vinicas envelhecidas.

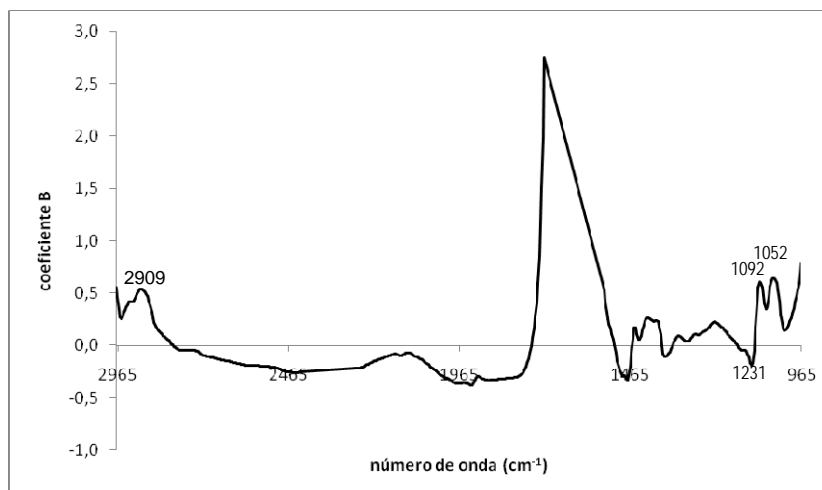
#### *Título alcoométrico volúmico*



**Figura 4.4-Relação entre o valor estimado e actual para o TAV, obtida pelo software desenvolvido na Universidade de Aveiro**



**Figura 4.5-Relação entre o valor estimado e actual para o TAV, obtida pelo software WineScan FT120 v.2.2.2.**



**Figura 4.6-Coeficiente B para a quantificação do TAV.**

O título alcoométrico volúmico é um parâmetro analítico com grande significância para o controlo de qualidade da aguardente vínica envelhecida, contudo é também essencial a sua exacta quantificação para determinar o valor associado ao imposto sobre o álcool (Decreto-Lei n.º 300/99 de 5 de Agosto de 1999).

As figuras 4.4 e 4.5 ilustram os modelos PLS1 obtidos para este parâmetro físico-químico. O modelo de calibração obtido pelo software desenvolvido na Universidade de Aveiro apresenta um erro associado à previsão (RMSECV) de 1,80% e  $R^2$  de 0,94. Enquanto que o modelo de calibração elaborado pelo software do equipamento WineScan FT120 apresenta um erro associado à precisão de 0,79% e  $R^2$  de 0,93.

Os valores de coeficiente de determinação, de acordo com os critérios propostos por Shenk et Westerhaus (1996), revelam informação quantitativa “excelente”, o que significa que as curvas de calibração, representadas nas figuras 4.4 e 4.5 ilustram uma relação linear entre os valores estimados pelos softwares e os valores determinados por análise à bancada, de acordo com o método oficial, para o parâmetro título alcoométrico volúmico.

De acordo com os resultado obtidos (Tabelas 4.1 e 4.2) a aplicação do modelo PLS1 construído pelo software desenvolvido na Universidade de Aveiro, poderá no futuro ser utilizado para quantificar o título alcoométrico volúmico em amostras desconhecidas de aguardentes vínicas envelhecidas, sendo que a metodologia FT-IR possa ser provavelmente considerada, com alternativa ao método oficial, pelas vantagens que apresenta, nomeadamente, em termos de tempo de análise e facilidade de execução, pela quantidade de amostra utilizada, etc.

Como os modelos PLS1 foram elaborados a partir de amostras de aguardentes vínicas envelhecidas provenientes de um ensaio (*realizado no âmbito do Projecto PAMAF – 2052 – Estudo integrado de madeiras, tecnologias de tanoaria e de produção de aguardentes velhas de qualidade, com apoio à denominação “Lourinhã”*), em que o valor de título alcoométrico volúmico varia entre 60%v/v e 70%v/v, para terem utilidade na quantificação desta propriedade em amostras de aguardentes vínicas envelhecidas destinadas à venda e consumo humano, deveriam ser alargado a amostras com título alcoométrico volúmico compreendido entre 38%v/v e 40%v/v, valores estes que são permitidos por lei.

No entanto os modelos PLS1 obtidos neste trabalho, apresentam-se em concordância com o trabalho desenvolvido por Cocciardi (2005), onde se revalam as potencialidades das técnicas espectroscópicas FT-NIR, FT-IR e SB-ATR/FT-IR e da análise multivariada, nomeadamente a regressão parcial em mínimos quadrados, para a análise de amostras de licores produzidos por destilação e de vinhos, designadamente para a quantificação do álcool nessas amostras (Cocciardi *et al.*, 2005). Os trabalhos de Lachenmeier em 2005 e 2007, com amostras de tequilas e bebidas espirituosas, respectivamente, apoiam os modelos PLS1 elaborados neste trabalho, dado que fazem uso da mesma técnica espectroscópica e da calibração multivariada para dosear o parâmetro físico-químico em estudo (Lachenmeier *et al.*, 2005; Lachenmeier *et al.*, 2007). Os resultados do trabalho de Nagarajan (2006), demonstram as potencialidade da técnica MIR-ATR aliada a regressão parcial em mínimos quadrados para a quantificação de etanol em bebidas espirituosas (Nagarajan *et al.*, 2006), confirmando assim os resultados do presente trabalho experimental.

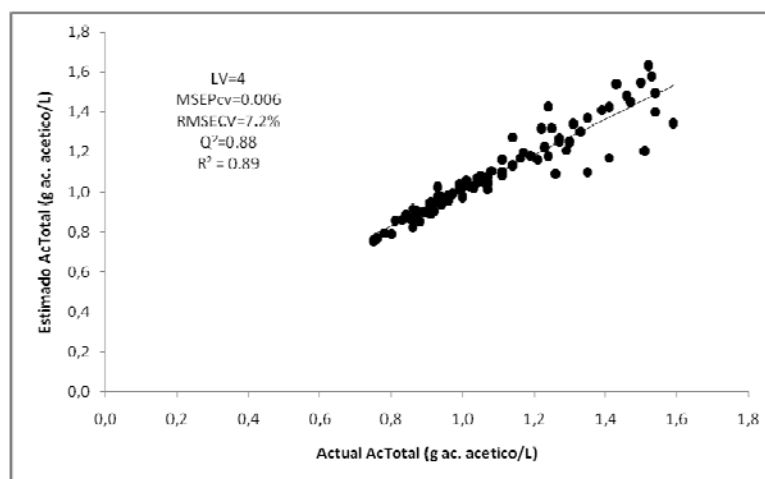
Pela observação da figura 4.6, as bandas com maior importância na caracterização da aguardentes vínicas envelhecidas relacionadas com este parâmetro físico-químico, variam entre 1250 e 1000  $\text{cm}^{-1}$ . Verifica-se que o aumento da intensidade das bandas, compreendidas entre 1250 e 1000  $\text{cm}^{-1}$  está relacionado com o aumento do teor de alcoólico das bebidas alcoólicas.

Observam-se três bandas localizadas entre 1231, 1092 e 1052  $\text{cm}^{-1}$ , que identificam a ligação C-O em álcoois primários e compostos fenólicos. As duas primeiras bandas de absorção localizadas entre 1092 e 1052  $\text{cm}^{-1}$  representam o alongamento da ligação C-O, num álcool primário (Nieuwoudt *et al.*, 2004, Cocciardi *et al.*, 2005; Nagarajan *et al.*, 2006; Bevin *et al.*, 2006). A banda evidenciada a 1231  $\text{cm}^{-1}$ ,

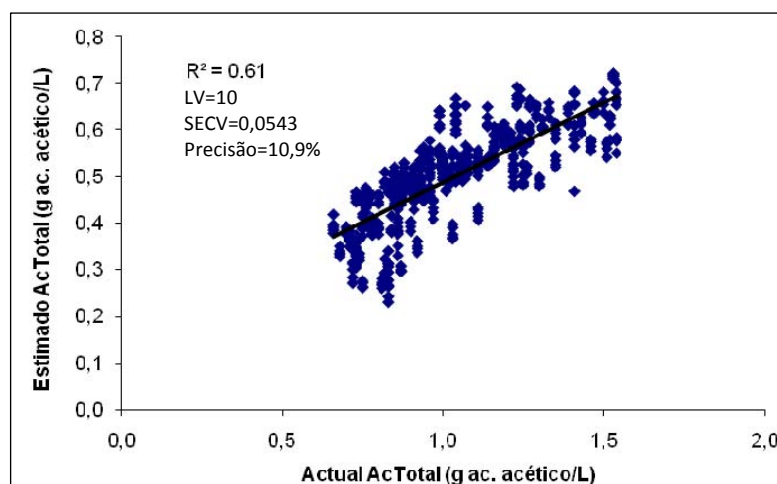
permite identificar o alongamento da ligação C-O em compostos fenólicos aromáticos (Coates, 2000).

A  $2909\text{ cm}^{-1}$ , visualiza-se banda que corresponde ao alongamento axial na ligação C-H dos compostos alifáticos (Coates, 2000; Nagarajan *et al.*, 2006; Bevin *et al.*, 2006).

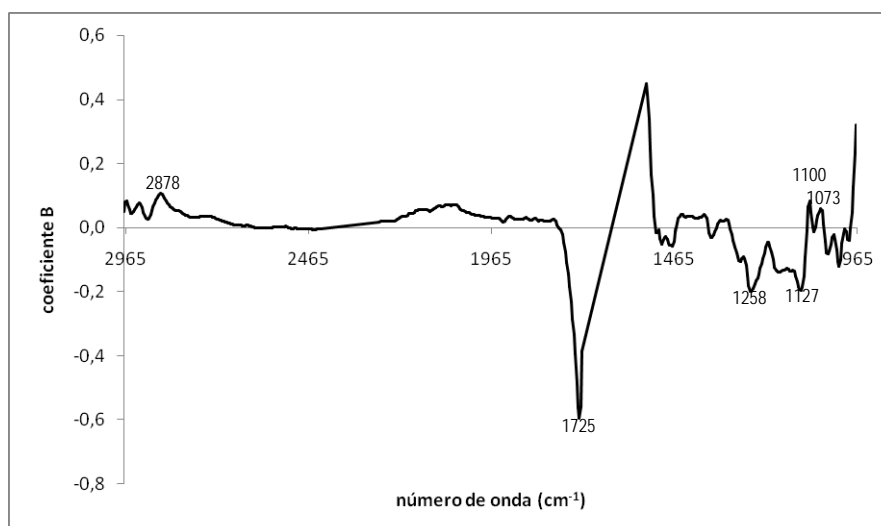
### *Acidez total*



**Figura 4.7 -Relação entre o valor estimado e actual para a AcTotal, obtida pelo software desenvolvido na Universidade de Aveiro.**



**Figura 4.8-Relação entre o valor estimado e actual para a AcTotal, obtida pelo software WineScan FT120 v.2.2.2.**



**Figura 4.9-Perfil dos coeficiente B para a quantificação da AcTotal.**

Os modelos PLS1 obtidos para o parâmetro físico-químico acidez total (figuras 4.7 e 4.8) revelam resultados distintos. O modelo elaborado pelo software desenvolvido na Universidade de Aveiro revela uma boa correlação entre os dados amostrais, dado que  $R^2$  é igual a 0,89; tem um valor associado ao erro de previsão (RMSECV) de 7,2%. O modelo construído pelo software do equipamento (WineScan FT120) apresenta um erro associado à previsão do modelo de 10,9% e  $R^2$  de 0,61. De acordo com os critérios propostos por Shenk e Westerhaus (1996), os valores de coeficiente de determinação para a curva de calibração apresentada na figura 4.7 revela informação quantitativa classificada como “boa”, no entanto a relação ilustrada na figura 4.8 apresenta uma distribuição das amostras com baixa correlação entre os dados (valor estimado e valor actual).

Tendo em consideração, os resultados obtidos para o modelo elaborado pelo software independente (desenvolvido na Universidade de Aveiro), pode-se afirmar que o modelo PLS1, poderá no futuro ser utilizado na quantificação da acidez total em amostras desconhecidas de aguardentes vínicas envelhecidas, sendo possível considerar a espectroscopia de infravermelho uma técnica alternativa ao método oficial, pelas suas vantagens. No entanto, o modelo apresenta limitações que acompanham a sua construção, pois denota-se que a curva de calibração da figura 4.7, revela uma tendência para a formação de um grupo de amostras em que o valor de AcTotal varia entre 0,8 e 1,2 g de ácido acético/L. O modelo deveria ser alargado a um maior número de

amostras, em que o parâmetro analítico, acidez total não ostente grande discrepância entre o valor mínimo e máximo.

Estes resultados são apoiados pelos trabalhos desenvolvidos por Cocciardi *et al.* 2005, onde se revalam as potencialidades das técnicas espectroscópicas (FT-NIR, FT-IR e SB-ATR/FT-IR) combinadas com a regressão parcial em mínimos quadrados para a análise e quantificação deste parâmetro físico-químico em amostras de licores e vinhos.

O trabalho de Nagarajan *et al.* 2006 confirma os resultados do modelo de calibração obtido pelo software desenvolvido na Universidade de Aveiro, revelando a capacidade da técnica espectroscópica (MIR-ATR) aliada à calibração multivariada para a quantificação do ácido tartárico em bebidas espirituosas. É de salientar que os resultados deste trabalho revelam maior linearidade em relação à distribuição das amostras (valores estimados e valores actuais), pois  $R^2$  é de 0,99; contudo o erro associado à previsão é de 17%, superior ao encontrado para o modelo PLS1 (figuras 4.7 e 4.8).

A acidez total expressa em g de ácido acético/L, representa de um modo simplificado a soma entre a acidez fixa e a acidez volátil de uma aguardente vínica envelhecida. O ácido acético não é o único composto químico responsável pela acidez total da aguardente, os ácidos orgânicos de cadeia curta, ácidos gordos e os ácidos fenólicos contribuem de forma positiva para a quantificação deste parâmetro físico-químico nas amostras em estudo.

As bandas com maior importância para as aguardentes vnicas envelhecidas (figura 4.9) relacionados com este parâmetro físico-químico, variam entre 1500 e 1100  $\text{cm}^{-1}$  e 1700  $\text{cm}^{-1}$ , que aumentam com o aumento de acidez total, isto é a sua variação é proporcional à concentração dos ácidos presentes na solução hidroalcoólica. As zonas de absorção do espectro de infravermelho com maior contributo para a quantificação da acidez total apresentam-se em concordância com os número de onda apresentados no trabalho de Cocciardi *et al.* (2005), em que se fez uso da mesma técnica espectroscópica de análise.

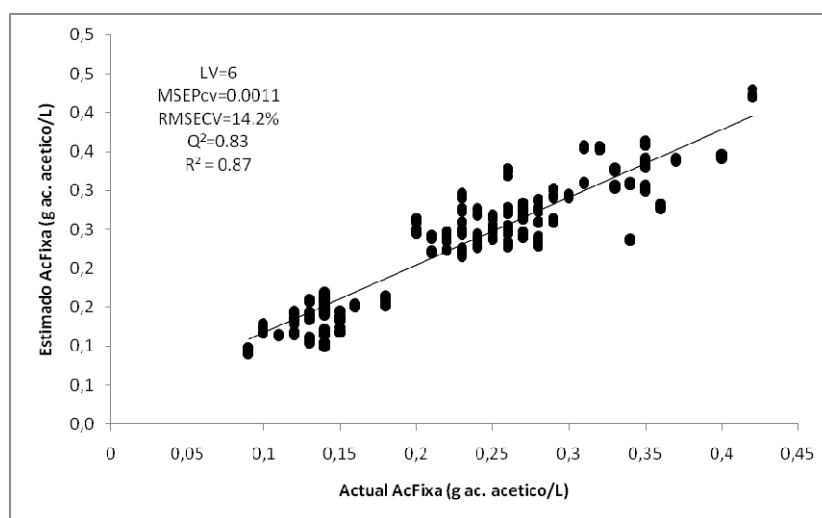
Pela observação da figura 4.9, a 1127  $\text{cm}^{-1}$  está localizada uma banda de absorção característica do alongamento da ligação C-O em fenóis alifáticos (Coates, 2000).

A banda espectral localizada a 1725  $\text{cm}^{-1}$  denuncia maior contributo para a quantificação do parâmetro acidez total. Esta banda de absorção pode traduzir o alongamento na ligação C=O nos ácidos carboxílicos (Nieuwoudt *et al.*, 2004; Moreira

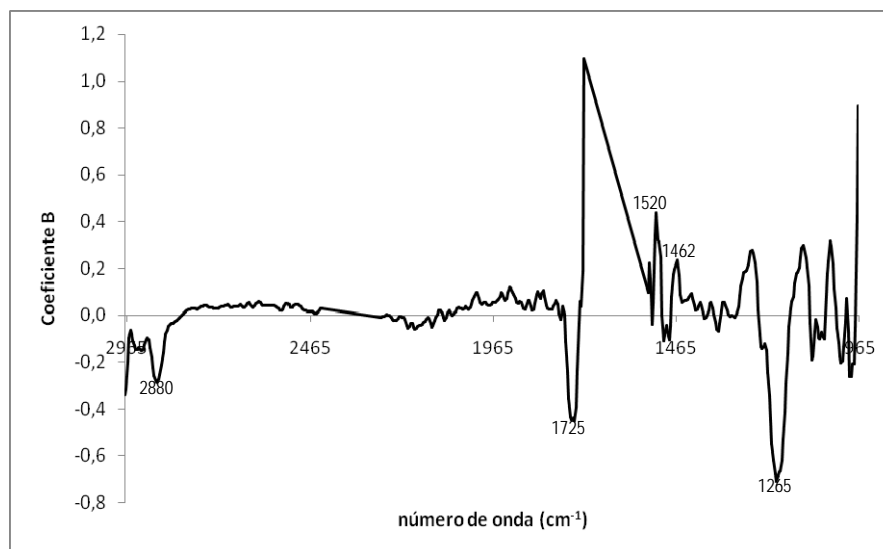
*et al.*, 2005; Cocciardi *et al.*, 2005; Nagarajan *et al.*, 2006); no entanto, esta banda insere-se na região espectral compreendida entre  $1760$  e  $1690\text{ cm}^{-1}$ , que de acordo com Bevin *et al.* (2006) contém informação relativamente ao alongamento da ligação C=O, em ácidos carboxílicos, mas também em aldeídos e ésteres, o que torna difícil referir com exactidão, que grupo funcional lhe é atribuído.

Na região espectral compreendida entre  $2960$  e  $2850\text{ cm}^{-1}$ , localiza-se a banda a  $2878\text{ cm}^{-1}$ , que ostenta informação relativa ao alongamento axial na ligação C-H em compostos alifáticos (Coates, 2000; Nagarajan *et al.*, 2006; Bevin *et al.*, 2006).

### *Acidez fixa*



**Figura 4.10-Relação entre o valor estimado e actual para a AcFixa, obtida pelo software desenvolvido na Universidade de Aveiro.**



**Figura 4.11- Perfil dos coeficientes B para a quantificação da AcFixa.**

O modelo PLS1 (figura 4.10) apresenta um erro associado à previsão de 14,2%, com  $R^2$  de 0,87, o valor de coeficiente de determinação sugere uma “boa” correlação entre os dados, tendo em consideração os critério apresentados por Shenk e Westerhaus (1996). No entanto, aparentemente este valor, não retrata a realidade da distribuição das amostras, dado o valor do erro de previsão associado ao modelo PLS1.

O modelo PLS1 apresenta algumas limitações quanto a ser utilizado no futuro para quantificar a acidez fixa em amostras desconhecidas de aguardente vínica envelhecida. Neste sentido, este modelo de calibração deveria ser alargado a um maior número de amostras, com a finalidade de alcançar uma relação que explique a linearidade entre os valores estimados em questão, e os valores actuais determinados de acordo com o método oficial, isto é com o intuito de obter um relação entre os valores observados e estimados que revele informação química de qualidade (Shenk e Westerhaus, 1996).

Os estudos que relatam as potencialidades da espectroscopia de FT-IR, no doseamento dos vários parâmetros físico-químicos, que nos permitem caracterizar e avaliar determinada bebida alcoólica, como vinhos, bebidas destiladas entre outras, não fazem referência a quantificação deste parâmetro. Neste sentido, o trabalho realizado revela-se pioneiro nesta área, contudo como já foi referido anteriormente, apresenta algumas limitações, como por exemplo o facto das amostras utilizadas na construção do modelo, serem aguardentes provenientes de um ensaio, apresentam a mesma origem,



mas revelam períodos de envelhecimento diferentes e barricas com características distintas.

A análise da figura 4.11, permite referir que os números de onda com maior importância nas aguardentes vínicas envelhecidas relacionados com este parâmetro físico-químico, variam entre 1500-1100  $\text{cm}^{-1}$  e 1700  $\text{cm}^{-1}$ , verificando-se que a sua variação é proporcional à concentração dos ácidos presentes na solução hidroalcoólica.

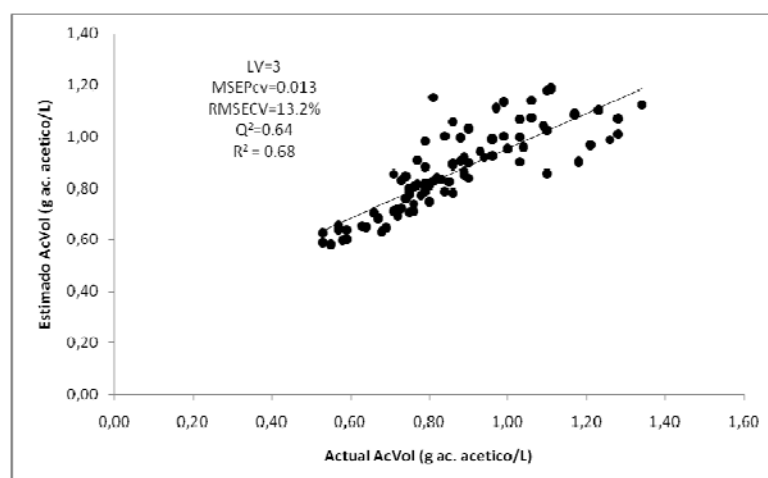
A ligação C-O dos ácidos carboxílicos é caracterizada pelo aparecimento de uma banda localizada entre 1300 e 1200  $\text{cm}^{-1}$ , que traduz a deformação axial, devido ao acoplamento da deformação angular no plano da ligação O-H e da deformação axial da ligação C-O (Coates, 2000; Nagarajan *et al.*, 2006).

A 1462  $\text{cm}^{-1}$  está localizada uma banda de absorção característica do alongamento da ligação C-H (Nieuwoudt *et al.*, 2004).

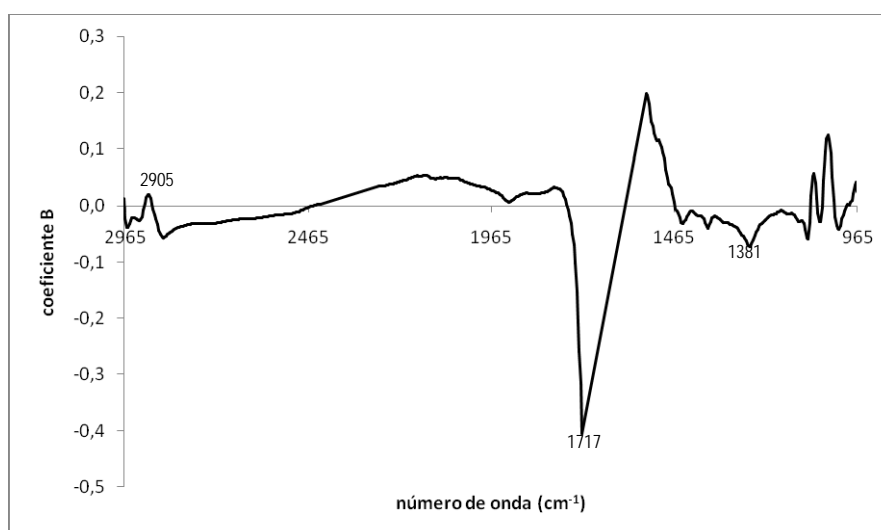
A presença de duas bandas a 1470 e a 1520  $\text{cm}^{-1}$  demonstram a presença da ligação dupla C=C em compostos químicos com anéis aromáticos. De acordo com a bibliografia existiriam quatro bandas de absorção características (Coates, 2000), neste trabalho apenas se observam duas dessas bandas de absorção, dado que pelas propriedades do aparelho existe um corte no espectro entre 1717 a 1544  $\text{cm}^{-1}$ .

A banda espectral localizada a 1725  $\text{cm}^{-1}$  denuncia maior contributo para a quantificação do parâmetro acidez fixa. Esta banda de absorção pode traduzir o alongamento na ligação C=O nos ácidos carboxílicos (Nieuwoudt *et al.*, 2004; Moreira *et al.*, 2005; Cocciardi *et al.*, 2005; Nagarajan *et al.*, 2006), no entanto, insere-se na região espectral compreendida entre 1760 e 1690  $\text{cm}^{-1}$ , que de acordo com Bevin *et al.* (2006) contém informação relativamente ao alongamento da ligação C=O, em aldeídos, ácidos carboxílicos e ésteres sendo difícil referir com exactidão, que grupo funcional lhe é atribuído.

A região espectral compreendida entre 2960 e 2850  $\text{cm}^{-1}$ , apresenta informação relativa ao alongamento axial na ligação C-H em compostos alifáticos (Coates, 2000; Nagarajan *et al.*, 2006; Bevin *et al.*, 2006).

*Acidez volátil*

**Figura 4.12-Relação entre o valor estimado e actual para a AcVol, obtida pelo software desenvolvido na Universidade de Aveiro.**



**Figura 4.13- Perfil dos coeficiente B para a quantificação da AcVol.**

O modelo PLS1 elaborado pelo software de análise multivariada: software desenvolvido na Universidade de Aveiro tem associado uma distribuição das amostras que revela, um menor ajuste entre os dados observados e estimados, logo valor mais baixo de coeficiente de determinação (0,69) (figura 4.12). De acordo com os critérios propostos por Shenk e Westerhaus (1996), um valor de  $R^2$  compreendido entre 0,7 e 0,5 é descrito como “bom”, o que demonstra uma boa separação das amostras, e indica que a calibração apenas pode ser usada como objectivos de discriminação. Um dado que apoia estes resultados, baseia-se no facto da acidez volátil ser determinado pela

diferença entre os valores de acidez total e de acidez fixa. Um outro aspecto, que apoia os resultados menos bons associados a este parâmetro analítico, caracteriza-se pelo facto desta propriedade físico-química, medir a composição química dos ácidos voláteis, logo um parâmetro muito sensível e susceptível de sofrer grandes alterações, tendo em conta as condições de armanezamento das aguardentes e isolamento das garrafas de vidro.

O modelo de calibração PLS1 apresenta um erro associado à previsão de 13,2% e coeficiente de determinação de 0,69. O modelo de calibração deveria de ser estendido a um maior número de amostras, onde o parâmetro em estudo caracterize melhor o produto, tendo como finalidade construir um modelo de calibração, que permita quantificar a acidez volátil de amostras de aguardente vínica envelhecida.

No caso de aguardentes vínicas envelhecidas a informação disponível, relativamente à problemática em estudo, é bastante limitada, e mesmo inexistente no caso da quantificação deste parâmetro em bebidas destiladas. No entanto, estes resultados são apoiados pelos trabalhos desenvolvidos em vinhos, nomeadamente pelos trabalhos de Patz *et al.* (2002) na quantificação da acidez volátil em novas amostras de vinhos, fazendo uso da regressão PLS1 aplicada aos espectros de FT-MIR, o valor de  $R^2$  é de 0,768. O trabalho de Rousseau *et al.* (2002) permitiu avaliar o valor da repetibilidade associada à determinação da acidez volátil nas uvas, utilizando o FT-IR, contudo este resultado revela a incapacidade do método para a sua análise. Contudo a analogia é a sustentabilidade do modelo não pode ser de todo considerada pelos trabalhos mencionados, pois há que salientar que a acidez volátil para as aguardentes vínicas envelhecias representa a soma dos ácidos voláteis, isto é o somatório dos ácidos que migram do vinho para o destilado, juntamente com os ácidos que são extraídos da madeira durante o processo de envelhecimento.

Neste sentido, o trabalho desenvolvido demonstra a primeira abordagem ao estudo da construção de modelos de regressão PLS1 que permitem quantificar este parâmetro analítico em aguardentes vínicas envelhecidas. Contudo, como foi referido anteriormente, apresenta limitações, que estão associadas às propriedades físicas e químicas que caracterizam a acidez volátil.

A observação da figura 4.13, permite referir que as bandas com maior importância nas aguardentes vínicas envelhecidas relacionados com este parâmetro físico-químico,

variam entre 1700 e 1300  $\text{cm}^{-1}$ , sendo que estas aumentam com o aumento da acidez volátil.

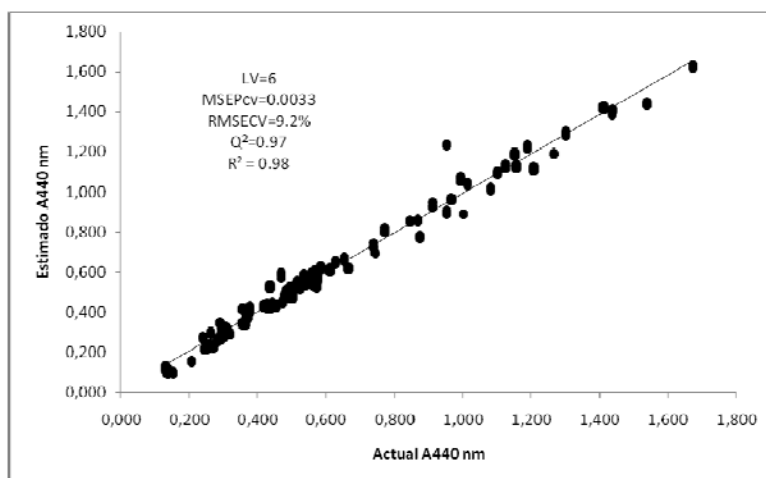
A figura 4.13 representa a contribuição a contribuição dos coeficientes B, para a quantificação da acidez volátil, a banda com maior contributo situa-se a 1381  $\text{cm}^{-1}$ , resultado da deformação da ligação O-H em ácidos carboxílicos ou da deformação da ligação C-H, no grupo  $-\text{CH}_3$  (Moreira *et al.*, 2005).

A banda de absorção visível a 1717  $\text{cm}^{-1}$  que surge nas figuras 4.9, 4.11 e 4.13 pode traduzir o alongamento presente na ligação C=O em ácidos carboxílicos (Moreira *et al.*, 2005). No entanto, devido à composição química muito diversificada da aguardentes vínicas envelhecidas em aldeídos, cetonas, ésteres e ácidos (Piggott, 1983; Belchior *et al.*, 2004), torna-se por vezes difícil atribuir com grande exactidão qual o grupo funcional presente que a induz.

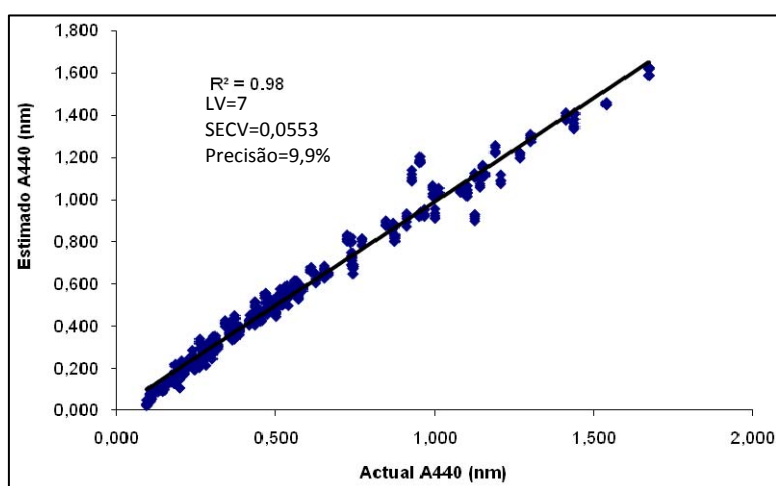
A região espectral compreendida entre 2960 e 2850  $\text{cm}^{-1}$ , apresenta informação relativa ao alongamento axial na ligação C-H em compostos alifáticos (Coates, 2000; Nagarajan *et al.*, 2006; Bevin *et al.*, 2006).

A aguardente vínica envelhecida é extremamente rica em compostos químicos do grupo carboxílico como os ácidos de cadeia simples, ácidos insaturados, os ácidos fenólicos (Caldeira, 2004), pelo que as bandas de absorção presentes nas figura 4.9, 4.11 e 4.13, evidenciam a composição química deste produto.

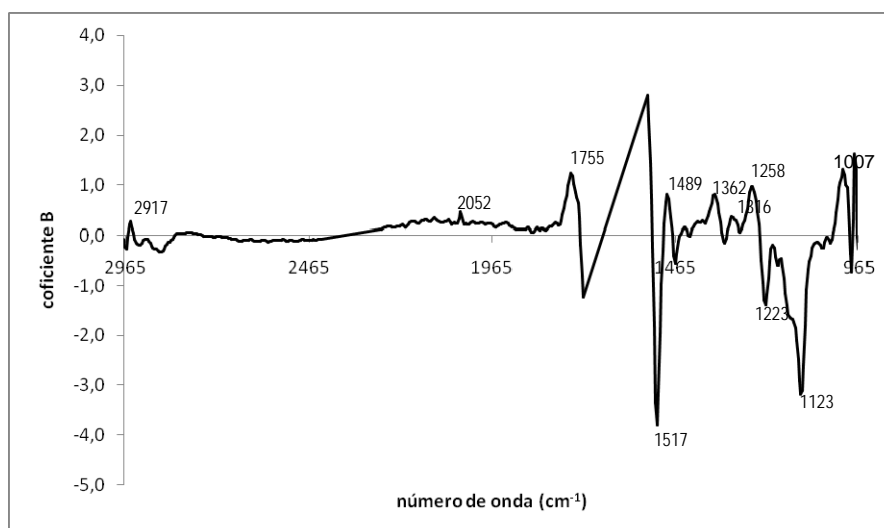
Os três parâmetros analíticos que se apresentam em seguida, têm na sua constituição, compostos químicos, nomeadamente açúcares (sacarose, ramnose, arabinose, xilose, galactose, etc), que ostentam zonas de absorção muito fortes, o que modifica o espectro, e consequentemente pode originar alterações no modelo de calibração (Patz *et al.*, 2004).

*Intensidade de cor - A 440 nm*

**Figura 4.14-**Relação entre o valor estimado e actual para a A440 nm, obtida pelo software desenvolvido na Universidade de Aveiro.



**Figura 4.15-**Relação entre o valor estimado e actual para a A440 nm, obtida pelo software WineScan FT120.



**Figura 4.16-Coefficiente b para a quantificação da intensidade da cor.**

Os modelos PLS1 que caracterizam a intensidade da cor a 440 nm apresentam uma “excelente” distribuição amostral entre os dados, de acordo com os critérios propostos por Shenk et Westerhaus (1996), pois os valores de coeficiente de determinação são de 0,97 e de 0,98 para os modelos obtidos a partir do software desenvolvido pela Universidade de Aveiro e do software do equipamento WineScan FT120 respectivamente. Estes valores referem informação quantitativa “excelente”, estabelecendo uma quase perfeita relação entre os valores estimados e os actuais. O valor de erro associados à previsão do modelo de calibração, da figura 4.14 é de 9,2%, enquanto que o erro associado à previsão do modelo de calibração, da figura 4.15 é de 9,9%. Os valores associados ao erro de previsão são muito semelhantes, neste contexto os modelos PLS obtidos podem ser utilizados para quantificar a intensidade da cor a 440 nm, em amostras desconhecidas, no entanto há a necessidade de estender o modelo a um maior número de amostras, dado que se observa uma tendência para a formação de um grupo de amostras com valores de A440 compreendidos entre 0,25 e 0,70 nm.

Em aguardentes vínicas envelhecidas, a informação química é muito limitada e neste caso inexistente, pois de acordo com a bibliografia não existem artigos científicos que façam referência a quantificação deste parâmetro físico-químico em bebidas alcoólicas destiladas. Contudo estes resultados são apoiados pelos trabalhos desenvolvidos em uvas, nomeadamente pelos trabalhos de Rousseau *et al.* (2002) permitiram avaliar o valor associado a repetibilidade nas determinações da intensidade da cor utilizando o espectrométo de infravermelho com Transformadas de Fourier, este

resultado revela um grau de precisão correcto, o que confirma a capacidade do método (FT-IR) para a sua análise (Rousseau *et al.*, 2002).

A elaboração de um modelo de calibração desenvolvido pelo software do equipamento WineScan FT120 é apoiado pelo modelo construído por um software independente, demonstra o primeiro estudo nesta área, isto na utilização de modelos PLS1 para quantificar a intensidade da cor a 440 nm, em amostras de aguardentes vónicas envelhecidas. Os resultados dos modelos denunciam a aplicabilidade futura do FT-IR na análise laboratorial deste parâmetro.

O valor comercial de uma aguardente vónica envelhecida depende das suas características intrínsecas, isto é da sua essência, que a distingue e diferencia como produto. Neste contexto, o parâmetro físico-químico intensidade da cor tem extrema importância para todos os intervenientes no processo de produção, comercialização e controlo de qualidade. Uma vez que, seu aspecto visual, determina a primeira impressão e orienta a percepção e opção do consumidor.

A cor de uma aguardente é tradicionalmente definida por um conjunto de pessoas, que compõem um painel de provadores, neste sentido, torna-se subjectiva, mesmo que exista alguma objectividade de critérios, através do treino dos provadores e da validação das câmaras que o constituem (Caldeira *et al.*, 1999). É, então essencial complementá-la e relacioná-la com a avaliação das características cromáticas por métodos instrumentais. A cor de uma aguardente está relacionada com a presença de compostos fenólicos que podem resultar da degradação térmica madeira.

A observação da figura 4.16, permite referir que os números de ondas com maior importância nas aguardentes vónicas envelhecidas relacionados com este parâmetro físico-químico, variam entre 1100-1700  $\text{cm}^{-1}$ , estas bandas aumentam com o aumento da intensidade da cor.

Na figura 4.16 representa a contribuição dos coeficientes B para a quantificação do parâmetro intensidade da cor, de acordo com o modelo de regressão PLS1. Visualiza-se um grande número de bandas de absorção na região espectral compreendida entre 1300-1000  $\text{cm}^{-1}$ , que estão relacionadas com a combinação dos grupos funcionais, como álcool, o ácido carboxílicos, etc. A banda localizada a 1007  $\text{cm}^{-1}$  indica a presença da ligação C-O num álcool primário, as bandas que

correspondem à ligação C-O em éteres insaturados e aromáticos, estão localizadas entre 1200-1050  $\text{cm}^{-1}$  e 1300-1250  $\text{cm}^{-1}$  (John Coates, 2000).

A zona espectral localizada entre 1363-1223  $\text{cm}^{-1}$ , deslocizada para valores de absorção mais baixos de acordo com a literatura, corresponde ao alongamento da ligação dupla entre dois átomos de carbono (John Coates, 2000; Nagarajan *et al.*, 2006).

A ligação C=C, em anéis aromáticos absorve radiação numa região espectral entre 1600-1450  $\text{cm}^{-1}$  o que é traduzido pela existência de quatro bandas de absorção, neste caso devido ao “corte” que o software do instrumento de FT-IR (WineScan) introduz no gráfico, só visualizamos a banda de absorção a 1493  $\text{cm}^{-1}$ . Na figura 4.16 apenas é possível visualizar duas dessas bandas a 1489 e 1517  $\text{cm}^{-1}$ , que identificam a existência de vibrações no anel aromático.

A banda de absorção a 1755  $\text{cm}^{-1}$  que identifica a alongação axial na ligação C=O característica de compostos químicos como os aldeídos, ácidos carboxílicos e ésteres (Nagarajan *et al.*, 2006; Bevin *et al.*, 2006), de acordo com os trabalhos de Bevin *et al.* (2006), localiza-se na região espectral compreendida entre 1690-1760  $\text{cm}^{-1}$ , que apresenta informação relativamente ao alongamento da ligação C=O, em aldeídos, ácidos carboxílicos e ésteres (Bevin *et al.*, 2006) é assim, difícil referir com exactidão, que grupo funcional lhe é atribuído.

A banda a 2052  $\text{cm}^{-1}$  refere a ocorrência um alongamento vibracional na ligação C-C=C-C=CH. A região espectral compreendida entre 2955-2886  $\text{cm}^{-1}$ , apresenta informação relativa ao alongamento axial na ligação C-H em compostos alifáticos (John Coates, 2000; Nagarajan *et al.*, 2006; Bevin *et al.*, 2006).



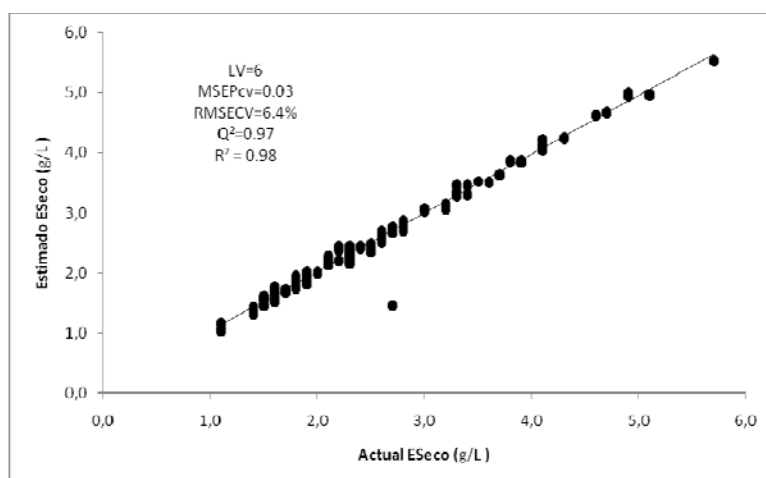
*Extracto seco*

Figura 4.17-Relação entre o valor estimado e actual para a ESeco, obtida pelo software desenvolvido pela Universidade de Aveiro.

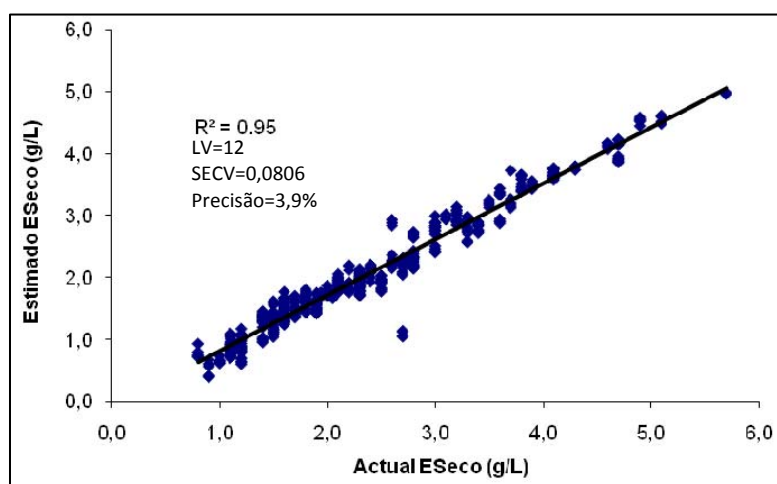
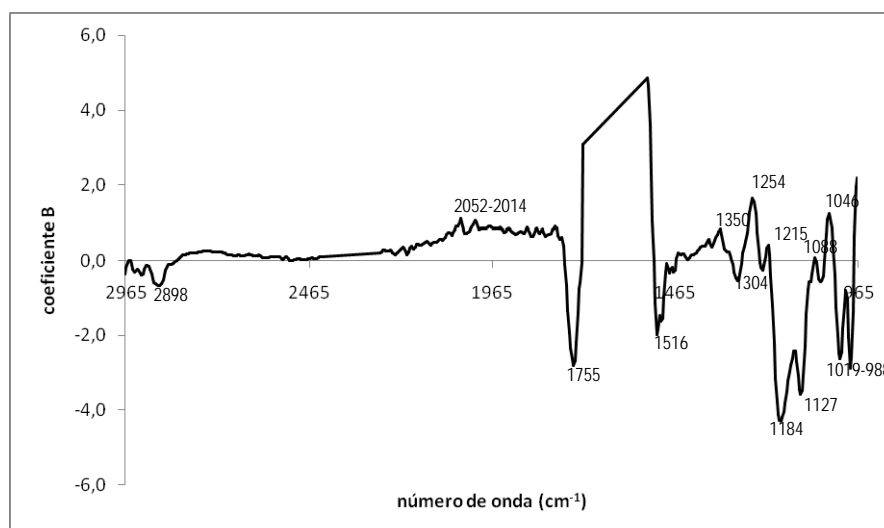


Figura 4.18-Relação entre o valor estimado e actual para a ESeco, obtida pelo software WineScan FT120.



**Figura 4.19-Coeficiente B para a quantificação do extracto seco.**

A determinação do parâmetro físico-químico extracto seco segue uma metodologia que implica um tempo de análise extenso (ver capítulo 3.1). De acordo com os resultados dos modelos PLS1 construídos neste trabalho a partir dos softwares de análise multivariada: software desenvolvido na Universidade de Aveiro e software de análise multivariada do equipamento WineScan FT120 v2.2.2, revela-se que as técnicas espectroscópicas apresentam vantagens significativas e podem ser utilizadas para quantificar o seu valor em novas amostras. Esta afirmação é apoiada pelas funções estatísticas que caracterizam os modelos de calibração (figuras 4.17 e 4.18). O modelo PLS1 elaborado a partir do software desenvolvido pela Universidade de Aveiro apresenta um  $R^2$  de 0,97, com erro associado à previsão de 6,4%. O modelo PLS1 obtido pelo software do equipamento WineScan FT120 apresenta um  $R^2$  de 0,95, com erro associado à previsão de 3,9%. Os valores de coeficiente de determinação, de acordo com os critérios propostos por Shenk e Westerhaus (1996), indicam informação quantitativa “excelente”, estabelecendo uma “quase perfeita” relação de linearidade entre os valores actuais e os valores estimados.

Este estudo aponta o primeiro trabalho da utilização de modelos PLS1, demonstrando as suas potencialidades para a quantificação desta propriedade físico-química em novas amostras de aguardentes vínicas envelhecidas. De tal forma que o modelo de calibração desenvolvido pelo software do aparelho WineScan FT120, é fundamentado pelo modelo construído por um software independente. Os resultados dos modelos denunciam, mais uma vez, a aplicabilidade futura do FT-IR na análise laboratorial deste parâmetro físico-químico.

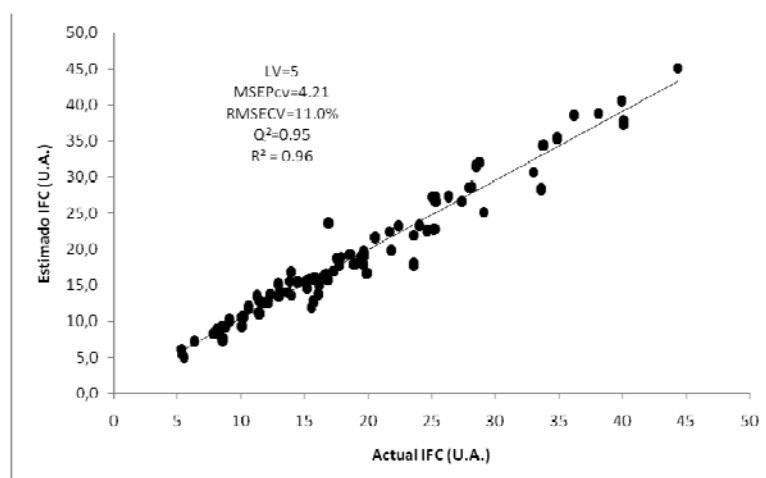
O extracto seco define-se pelo conjunto de matérias secas totais, existentes na aguardente vínica e que em determinadas condições de temperatura e pressão, não se volatilizam.

Na figura 4.19 podemos identificar um conjunto de bandas de absorção, que permite identificar alguns grupos funcionais presentes na composição química da aguardente vínica, os números de ondas com maior importância nas aguardentes víquicas envelhecidas relacionados com este parâmetro físico-químico, variam entre 1100-1700  $\text{cm}^{-1}$ , estas bandas aumentam com o aumento do extracto seco.

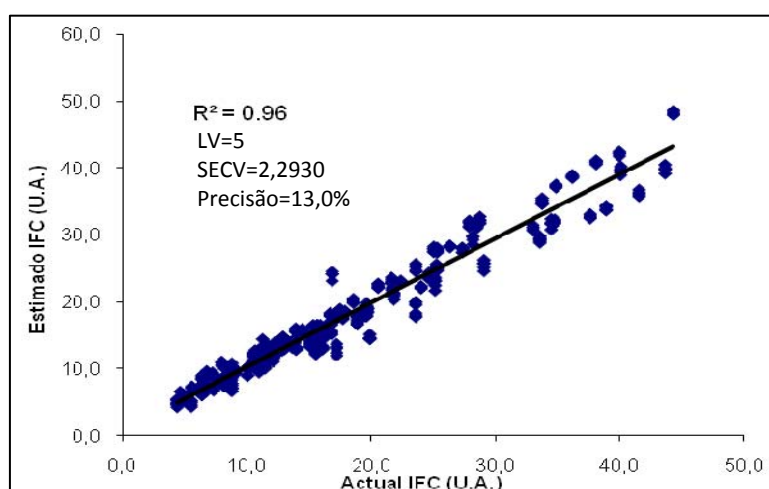
Na figura 4.19 podemos identificar um conjunto de bandas de absorção, que permite identificar alguns grupos funcionais presentes na composição química da aguardente vínica. A banda a 988  $\text{cm}^{-1}$  identifica a deformação angular simétrica fora do plano na ligação  $-\text{CH}=\text{CH}-(trans)$ . As três bandas localizadas entre 1121 e 1019  $\text{cm}^{-1}$  identificam a presença da ligação química C-O, que é característica dos álcoois primários. A banda de absorção presente a 1215  $\text{cm}^{-1}$  permite identificar a ligação C-O em compostos fenólicos aromáticos. A presença de duas bandas de absorção, uma localizada a 1245  $\text{cm}^{-1}$  e a outra a 1304  $\text{cm}^{-1}$  identificam a alongação axial na ligação C-O em ésteres insaturados e aromáticos. A banda a 1350  $\text{cm}^{-1}$  identifica a deformação angular simétrica na ligação  $\text{CH}_3$  (Morreira *et al.*, 2005). A banda de absorção que se caracteriza como sendo estreita e alongada a 1516  $\text{cm}^{-1}$  permite mais uma vez constatar a existência de vibrações no anel aromático, como se afirmou na figura 4.9 e 4.15.

A existência de uma banda a 1755  $\text{cm}^{-1}$  identifica a alongação axial na ligação  $\text{C}=\text{O}$  em presente aldeídos, ácidos carboxílicos e ésteres (Nagarajan *et al.*, 2006; Bevin *et al.*, 2006). As duas bandas de absorção localizadas entre 2058-2014  $\text{cm}^{-1}$  referem a ocorrência um alongamento vibracional na ligação  $\text{C}-\text{C}=\text{C}-\text{C}=\text{CH}$ . As três bandas situadas entre 2962 e 2890  $\text{cm}^{-1}$  identificam a alongação axial na ligação C-H em compostos alifáticos (John Coates, 2000; Nagarajan *et al.*, 2006).

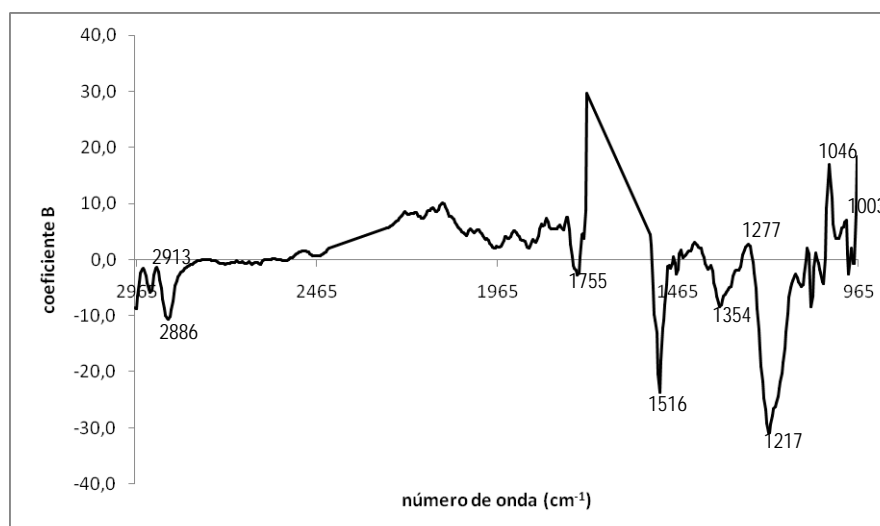
### *Índice de Folin-Ciocalteu*



**Figura 4.20-Relação entre o valor estimado e actual para o IFC, obtida pelo software desenvolvido pela Universidade de Aveiro.**



**Figura 4.21-Relação entre o valor estimado e actual para o IFC, obtida pelo software desenvolvido na Universidade de Aveiro.**



**Figura 4.22-Coeficiente B para a quantificação do índice de Folin-Ciocalteu.**

Tal como os modelos PLS1 elaborados para os parâmetros físico-químicos intensidade da cor a 440 nm e extracto seco, os resultados dos modelos PLS1 elaborados pelos softwares de análise multivariada: software desenvolvido na Universidade de Aveiro e software de análise multivariada do equipamento WineScan FT120 v2.2.2, (figuras 4.20 e 4.21) apresentam uma relação de linearidade, na distribuição amostral entre os valores estimados e os valores actuais. Os valores de coeficiente de determinação, de acordo com os critérios propostos por Shenk et Westerhaus (1996), revelam informação quantitativa “excelente”. O modelo PLS1 elaborado a partir do software desenvolvido na Universidade de Aveiro apresenta um  $R^2$  de 0,96; com erro associado à previsão de 11,0%. O modelo PLS1 obtido pelo software do equipamento WineScan FT120 apresenta um  $R^2$  de 0,98; com erro associado à previsão de 13,0%.

Para esta bebida alcoólica, a informação química é muito limitada e neste caso inexistente, dado que não existem artigos científicos que façam referência a quantificação deste parâmetro físico-químico em bebidas alcoólicas destiladas. Contudo estes resultados são apoiados pelos trabalhos desenvolvidos em uvas, nomeadamente pelos trabalhos de Rousseau *et al.* (2002), em que fazendo uso da espectroscopia de infravermelho com Transformadas de Fourier, para avaliar o valor associado a repetibilidade nas determinações do índice de Folin-Ciocalteu, este resultado demonstra grau de precisão “bom” na medição, o que fundamenta a capacidade do método (FT-IR) para a sua análise (Rousseau *et al.*, 2002).

O teor dos polifenóis totais é determinado pela reacção química com o reagente de Folin-Ciocalteu, (que se baseia no facto que em meio alcalino os fenóis reduzem a mistura dos ácidos fosfotungstico e fosfomolibdico em óxidos de tungsténio e molibdénio de cor azul).

Na figura 4.22 podemos identificar um conjunto de bandas de absorção, que permite identificar alguns grupos funcionais presentes na composição química da aguardente vínica, os números de ondas com maior importância nas aguardentes vnicas envelhecidas relacionados com este parâmetro físico-químico, variam entre 1100-1700  $\text{cm}^{-1}$ , estas bandas aumentam com o aumento do índice de Folin-Ciocalteu.

A banda de absorção localizada a 1003  $\text{cm}^{-1}$  identifica a deformação angular no plano na ligação C-H em compostos aromáticos, do tipo guaiacilo. Observam-se três bandas que identificam a alongação axial na ligação química C-O em álcoois, estas localizam-se entre 1217-1003  $\text{cm}^{-1}$ . A existência de duas bandas a 1046 e a 1277  $\text{cm}^{-1}$  identifica esta ligação química em éteres aromáticos e vinílicos. A comprovar a existência da ligação entre C-H surge a banda de absorção localizada a 1354  $\text{cm}^{-1}$  (Nagarajan *et al.*, 2006). A banda de absorção a 1516  $\text{cm}^{-1}$  identifica a ocorrência de vibrações no anel aromático, esta absorção relaciona-se com a presença dos compostos fenólicos, como a vanilina, o guaiacol, eugenol. A banda de absorção a 1755  $\text{cm}^{-1}$  é atribuída à ligação química C=O em aldeídos, ésteres e cetonas (Moreira *et al.*, 2005), No entanto de acordo com os trabalhos de Bevin *et al.* e Nagarajan *et al.* em 2006, esta banda pode traduzir também a ligação C=O em ácidos carboxílicos (Bevin *et al.* 2006; Nagarajan *et al.*, 2006). As três bandas situadas entre 2962 e 2886  $\text{cm}^{-1}$  identificam a alongação axial na ligação C-H em compostos alifáticos(John Coates, 2000; Nagarajan *et al.*, 2006).

Os modelos de calibração desenvolvido pelo software do equipamento WineScan FT120 para os parâmetros físico-químicos: intensidade de cor, extracto seco e índice de Folin-Ciocalteu aconcordância com o modelos construídos por um software independente, demonstrando-se pioneiro na quantificação deste propriedades analíticas em amostras de aguardentes vnicas envelhecidas. Os resultados dos modelos PLS1, tendo em consideração os valores das funções estatísticas, denunciam a aplicabilidade futura do FT-IR na análise laboratorial deste parâmetro, isto é no seu doseamento em amostras de aguardentes vnicas envelhecidas.

De forma a resumir a informação ilustrada no capítulo 4.2, é apresentada a Tabela 4.3 onde se associa a cada parâmetro físico-químico estudado neste trabalho experimental as bandas de absorção na região do infravermelho que têm maior contributo para a propriedade analítica em causa.

**Tabela 4.3-**Resumo da informação química espectral.

| Parâmetro físico-químico     | Banda ( $\text{cm}^{-1}$ ) | Interpretação   |
|------------------------------|----------------------------|---|
| Título alcoométrico volúmico | 1092-1052                  | Indica a deformação axial na ligação C-O em álcoois primários.  |
|                              | 1231                       | Identifica a deformação axial ligação C-O em compostos fenólicos.   |
|                              | 2909                       | Identifica a deformação axial na ligação C-H em compostos alifáticos.   |
| Acidez total                 | 1121                       | Identifica a deformação axial ligação C-O em fenóis alifáticos.   |
|                              | 1725                       | Identifica a deformação axial na ligação C=O em ácidos carboxílicos, aldeídos, ésteres ou cetonas .   |
|                              | 2878                       | Identifica a deformação axial na ligação C-H em compostos alifáticos.   |
| Acidez fixa                  | 1265                       | Identifica a ligação C-O em ácidos carboxílicos.  |
|                              | 1462                       | Identifica o alongamento da ligação C-H.  |
|                              | 1465<br>1520               | Representa a ligação C=C.   |
|                              | 1725                       | Identifica a deformação axial na ligação C=O em ácidos carboxílicos aldeídos, ésteres ou cetonas.   |
| Acidez volátil               | 1381                       | Representa a deformação na ligação O-H em ácidos carboxílicos ou a deformação na ligação C-H, na molécula $\text{CH}_3$ .   |
|                              | 1725                       | Identifica a alongação axial na ligação C=O em ácidos carboxílicos aldeídos, ésteres ou cetonas.  |
|                              | 1007                       | Indica a deformação axial na ligação C-O em álcoois primários.  |
|                              | 1123                       | Identifica a deformação angular no plano da ligação C-H em compostos aromáticas do tipo siringilo, pode também identificar a alongação axial na ligação C-O em álcoois secundários. |

|                    |              |   |
|--------------------|--------------|---|
| Intensidade da cor | 1258<br>1465 | Identifica a deformação axial na ligação C-O (de ácidos carboxílicos) devido ao acoplamento da deformação angular no plano da ligação O-H e a alongação axial de C-O.   |
|                    | 1223<br>1363 | Identifica o alongamento da ligação C=C.  |
|                    | 1489<br>1517 | Identifica a alongação na ligação C=C em compostos aromáticos.(existência de núcleos aromáticos. A banda de $1517\text{cm}^{-1}$ é mais intensa, que a banda de $1489\text{cm}^{-1}$ , se o grupo fenilo estiver conjugado com outro grupo funcional (estas bandas demonstram a ocorrência de vibrações no anel aromático). |
|                    | 1755         | Identifica a alongação axial na ligação C=O em aldeídos e ésteres, cetonas ou ácidos carboxílicos.  |
|                    | 2052         | Refere a ocorrência um alongamento vibracional na ligação C-C=C-C=CH .  |
|                    | 2917         | As três bandas identificam a alongação axial na ligação C-H em compostos alifáticos.  |
| Extracto seco      | 988          | Identifica a deformação angular simétrica fora do plano na ligação -CH=CH-(trans).  |
|                    | 1254<br>1304 | Estas duas bandas identificam a alongação axial na ligação C-O em ésteres insaturados e aromáticos.   |
|                    | 1350         | Identifica a deformação angular simétrica na ligação CH <sub>3</sub> .  |
|                    | 1516         | Identifica a ocorrência de vibrações no anel aromático.   |
|                    | 1755         | Identifica a deformação axial na ligação C=O em aldeídos, ésteres,cetonas ou ácidos carboxílicos.   |
|                    | 2058-2014    | Refere a ocorrência um alongamento vibracional na ligação C-C=C-C=CH .  |
| Índice de Folin-   | 2890-2962    | Identificam a deformação axial na ligação C-H em compostos alifáticos.  |
|                    | 1003         | Identifica a deformação angular no plano na ligação C-H em compostos aromáticos, do tipo guaiacilo.   |
|                    | 1046         | Indica a deformação axial na ligação C-O em álcoois primários.  |
|                    | 1217         | Identifica a ligação C-O em compostos fenólicos.  |
| Índice de Folin-   | 1046<br>1277 | Estas duas bandas identificam a alongação axial na ligação C-O em éteres aromáticos e vinílicos.  |



---

|            |           |   |
|------------|-----------|---|
| Ciocalteau | 1354      | Identifica a deformação angular simétrica na ligação CH <sub>3</sub> .                          |
|            | 1516      | Identifica a ocorrência de vibrações no anel aromático.   |
|            | 1755      | Identifica a deformação axial na ligação C=O ésteres, aldeídos, cetonas ou ácidos carboxílicos. |
|            | 2886-2962 | As três bandas identificam a deformação axial na ligação C-H em compostos alifáticos.           |

## 5. Conclusão

A metodologia de FT-IR aliada à análise multivariada, em particular ao método de regressão PLS1 permite obter um conjunto de modelos para a calibração e previsão de parâmetros de interesse para a caracterização de aguardentes vínicas. Por outro lado, este trabalho demonstra que é possível distinguir as aguardentes vínicas em função do período de envelhecimento, recorrendo ao PCA dos espectros de FT-IR das aguardentes vínicas.

No âmbito deste trabalho obtiveram-se valores de coeficientes de determinação considerados bons que variam entre 0,96 e 0,97 para as relações estabelecidas entre os métodos de análise de bancada (métodos oficiais) para os parâmetros analíticos: título alcoométrico volúmico, intensidade da cor a 440 nm, extracto seco e índice de Folin-Ciocalteu e a informação espectral para cada um destes parâmetros, obtido pelo software desenvolvido na Universidade de Aveiro.

Tendo em consideração os valores obtidos para os modelos, nomeadamente, os valores de  $R^2$  e de RMSECV apresentados na Tabela 4.1 e 4.2 (modelos de calibração elaborados pelo software desenvolvido na Universidade de Aveiro; modelos de calibração elaborados pelo software do equipamento WineScan FT 120) podemos dizer que a técnica analítica em estudo, a espectroscopia de infravermelho com Transformadas de Fourier revela capacidade para ser utilizada na quantificação e qualificação dos diferentes parâmetros físico-químicos, em novas amostras de aguardente vínica envelhecida.

A comparação entre os modelos PLS1 obtidos pelo software desenvolvido na Universidade de Aveiro e pelo software do aparelho WineScan FT120 revela que o aparelho desenvolvido pela Foss é ideal para a aquisição de espectros de amostras de aguardentes vínicas envelhecidas em tempo curto, pois a análise é extremamente rápida, no entanto o software deste equipamento, revela aspectos menos positivos na análise multivariada de dados, de acordo com os valores da Tabela 4.2

De facto, verifica-se que todos os modelos apresentam um número de variáveis latentes superior, em comparação com os observados na análise multivariada apresentada pelo software desenvolvido na Universidade de Aveiro. Estes resultados indicam que os modelos fornecidos pelo software do equipamento WineScan FT120 não se revelam os mais adequados para serem utilizados na previsão destes parâmetros

em novas amostras, dado que os modelos de calibração previsão surgem sobrestimados, isto é, revelam a introdução de ruído em cada modelo.

A nível da análise estrutural do produto analisado, a aguardente vínica, o FT-IR permite concluir que existem duas zonas no espectro de absorção que têm maior interesse sob o ponto de vista da sua composição química.

As duas zonas de absorção estão compreendidas entre 1200-1000  $\text{cm}^{-1}$  e 1750-1400  $\text{cm}^{-1}$ . A primeira zona faz referência a ligações químicas C-O, no grupo funcional hidroxil, que engloba os compostos alifáticos e os aromáticos. A segunda gama de frequências de absorção mais abrangente é característica das ligações químicas do tipo C=O em ácidos carboxílicos, em aldeídos alifáticos e aromáticos, em cetonas cíclicas. É uma zona importante porque envolve com compostos ácidos, como também as macromoléculas como os açúcares redutores.

Embora a tecnologia de FT-IR não permita fazer identificação de componentes como por exemplo as técnicas de cromatografia gasosa-olfactometria, cromatografia líquida de alta resolução (Canas, 2003; Caldeira, 2004) e espectrometria de massa, ajuda-nos todavia a caracterizar as amostras em termos quantitativos e qualitativos após calibração por técnicas multivariadas.

Em suma, a espectroscopia de infravermelho com Transformadas de Fourier pode ser utilizada como uma técnica de análise de rotina, uma vez que proporciona ao seu utilizador um conjunto de vantagens quando comparada com os métodos químicos tradicionais e oficiais, como:

- a rapidez,
- a facilidade de execução,
- a não necessidade de preparação da amostra,
- o facto de ser um método não-destrutivo,
- a pequena quantidade de amostra utilizada,
- a multiplicidade de análises num só espectro.

No entanto o seu uso em análises quantitativas, popularizou-se apenas com a crescente disponibilidade de recursos computacionais e de aplicações de análise multivariada.

Quando desenvolvidos os modelos de calibração com o auxílio das técnicas quimiométricas, a espectroscopia de infravermelho com transformadas de Fourier, revela-se um técnica poderosa para análise quantitativa e qualitativa.

Para desenvolver os modelos de calibração devemos dispor de uma grande diversidade de amostras, com características físicas e químicas próximas as que vão ser objecto de estudo.

Os resultados deste trabalho permitem perspectivar futuras investigações nesta área, sobre os seguintes aspectos:

- validar dos modelos PLS para os vários parâmetros em estudo, neste trabalho, usando amostras externas aos modelos.
- estender os modelos PLS a um maior número de amostras de aguardentes vînicas envelhecidas, visto que apenas trabalhamos com amostras provenientes de um ensaio, que tem a mesma origem.
- construir os modelos de PLS para os sete parâmetros em estudo, tendo em consideração a toda a faixa espectral de análise ( $5012\text{-}916\text{ cm}^{-1}$ ), isto é sem ter em conta os cortes que o aparelho apresenta.
- aplicar a análise em componentes principais para a distinção das aguardentes vînicas envelhecidas, de acordo com o espécie de botânica de madeira utilizada para a construção das quartolas.

---

**Bibliografia**

Abreu S., Alves A., Oliveira B., Herbert P., 2005. Determination of ethyl carbamate in alcoholic beverages: an interlaboratory study to compare HPLC-FLD with GC-MS methods. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 382, 498–503.

Artajona J., Barbero E., Llobet M., Marco J., Parente F., 1991. Influence du “bousinage” de la barrique sur les qualités organoleptiques des barriques vieilles en fûts de chêne. In: *Les eaux-de-vie traditionnelles d’origine viticole*, 197-205, Bertrand A. (ed.), Lavoisier-TER & DOC, Paris.

Baeten V., Aparicio R., 2000. Edible oils and fats authentication by Fourier transform Raman spectroscopy. *Biotechnology, Agronomy Society and Environment*, 4 (4), 196-203.

Baldwin S., Andreasen A., 1974. Congener development in bourbon whisky matured at various proofs for twelve years. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, 57 (4), 940-950.

Barros A., Reis A., Mafra I., Coimbra M., Degadillo I., 2003. Análise exploratória de espectros de FT-IR para a caracterização de polissacarídeos. *6º Encontro de Química de Alimentos*, Lisboa.

Baumann K., 2003. Cross Validation as the objective function for variable-selection techniques. *Trends in Analytical Chemistry*, 22, 6.

Beebe K.R., Kowalski B.R., 1987. An introduction to multivariate calibration and analysis. *Analytical Chemistry*, 59, 1007-1017.

Beebe K.R., Pell R. J., M. B. Seasholtz M. B., 1998. *Chemometrics: A Practical Guide*, John Wiley & Sons, New York.

Belchior A. P., Caldeira I., Costa S., Tralhão G., Ferrão A., Mateus A. M., Carvalho E., 2001. Evolução das características físico-químicas e organolépticas de aguardentes

---

Lourinhã ao longo de cinco anos de envelhecimento em madeira de carvalho e de castanheiro. *Ciência Técnica Vitivinícola*, 16, 81-94.

Belchior A. P., Caldeira I., Tralhão G., Costa S., Lopes C., Carvalho E., (1998). Incidência da origem e da queima da madeira de carvalho (Q. pyrenaica, Q. robur, Q. sessiliflora, Q.alba/Q.stellata+Q. lyrata/Q. bicolor) e de castanho (C. sativa) em características físico-químicas e organolépticas de aguardentes Lourinhã em envelhecimento. *Ciência Técnica Vitivinícola*, 13 (1-2), 107-118.

Belchior A. P., Carneiro L. C., 1972. Identification de substances extraites du bois neuf de chêne du Limousin par des eaux-de-vin. *Connaissance de la vigne et du Vin*, 6, 356-372.

Belchior A. P, Carvalho E. C., 1984a. Determinação da acidez total em aguardentes. Estudo comparativo de indicadores. *Ciência Técnica Vitivinícola*, 3 (2), 61-71.

Belchior A. P, Carvalho E. C., 1984b. Métodos de Análise de Aguardentes. I. Análise clássica. Instituto Nacional de Investigação Agrária e de Extensão Rural. Estação Vitivinícola Nacional de Dois Portos.

Belchior A. P, Carvalho E. C., 1984. A cor em aguardentes vínicas envelhecidas método: métodos espectrofotométricos de determinação e relação com os teores em fenólicas totais. *Ciência Técnica Vitivinícola*, 2, 29-37.

Belchior A. P, Mateus A., Soares A., 2005. Comparação do envelhecimento de agurdenes Lourinhã em vasilhas de madeiras de castanheiro e de carvalho em dois volumes. *Ciência Técnica Vitivinícola*, 20 (2), 91-103.

Belchior A. P, Mateus A., Caldeira I., 2002. Efeitos das lotagens em aguardentes velhas da Lourinhã. *Ciência Técnica Vitivinícola*, 17 (2), 53-59.

Belchior A. P, Mateus A., Canas S., Caldeira I., 2004. Prova de consumidor versus prova técnica de aguardentes velhas. *Ciência Técnica Vitivinícola*, 19 (2), 77-87.

- Bevin C., Fergusson A., Perry W., Janik L., Cozzolino D., 2006. Development of a rapid “fingerprinting” system for wine authenticity by mid-infrared spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 9173-9178.
- Beullens K., Kirsanov D., Irudayaraj J., Rudnitskaya A., Legin A., Nicolai B., Lammertyn J., 2006. The electronic tongue and ATR-FTIR for a rapid detection of sugars and acid in tomatoes. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 116, 107-115.
- Bordeu E., Formas G., Agosin E., 2004. Research note proposal for a standardized set of sensory terms for pisco, a young muscat wine distillate. *American Journal of Enology and Viticulture*, 55 (1), 104-1007.
- Borin A., 2003. Aplicação de Quimiometria e Espectroscopia no Infravermelho no Controle de Qualidade de Lubrificantes. *Dissertação de Mestrado, UNICAMP*. São Paulo.
- Bouvier J. C., 2001. Réflexion sur l’analyse oenologique par spectrométrie infrarouge. *Revue Française d’Oenologie*, 191, 16-17.
- Bricout K., 1971. Analyse de quelques constituants dérivés du chêne dans les vieilles eaux-de-vie d’Armagnac. *Annales de Technologie Agricole*, 20, 217-223.
- Brun S., 1979. Détermination des composés phénoliques totaux par le réactif de Folin-Ciocalteau . Feuillet Vert d’ Organisation Internationale du Vin, 681.
- Bunham A., MacGregor J., Viveros R., 1999. Latent variable multivariate regression modeling. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 48, 167-180.
- Caldeira I., 2004. O aroma de aguardentes vínicas envelhecidas em madeira. Influência da tecnologia de tanoaria, *Tese de Doutorado, Universidade de Lisboa*.
- Caldeira I., Belchior A. P., Clímaco M. C., Sousa B., 2002. Aroma profile of portuguese brandies aged in chestnut and oak woods. *Analytica Chimica Acta*, 458, 55-62.

Caldeira I., Clímaco M. C., Belchior A. P., 1999. Análise por GC-EM de compostos voláteis de madeiras utilizadas no envelhecimento de aguardentes. *In Actas do 1.º Encontro Nacional de Cromatografia*. P14, 75-76, Lisboa.

Caldeira I., Clímaco M. C., Sousa B.; Belchior A. P., 2006. Volatile composition of oak and chestnut woods used in brandy ageing: Modification induced by heat treatment. *Journal of Food Engineering*, 76, 202-211.

Caldeira I., Mateus A. M., Belchior A. P., 2006. Flavour and odour profile modifications during the first five years of Lourinhã brandy maturation on different wooden barrels. *Analytica Chimica Acta*, 563, 264-273.

Canas S., 2003. Estudo dos compostos extraíveis de madeiras (Crvalho e Castanheiro) e dos processos de extracção na perspectiva do envelhecimento em Enologia, *Tese de Doutoramento, Universidade de Lisboa*.

Canas S., Belchior A. P., Caldeira I., Spranger M. I., Sousa B., 2000. Evaluation de la couleur des trois premières années de vieillissement. *Ciência Técnica Vitivinícola*, 15 (1), 1-14.

Canas S., Belchior A. P., Mateus A., Spranger M. I., Sousa B., 2002. Kinetics of impregnation/evaporation and release of phenolic compounds from wood to brandy in experiental model. *Ciência Técnica Vitivinícola*, 17 (1), 1-14.

Canas, S., Belchior A. P., Spranger M. I., Sousa B., 2004a. Extracção e difusão dos compostos de massa molecular baixa da madeira ao longo do primeiro ano de envelhecimento de uma aguardente da Lourinhã. *In Actas do 6.º Simpósio de Vitivinicultura do Alentejo*,. 2, 121-128.

Canas, S., Caldeira I., 2006a. Novas aquisições nas tecnologias de envelhecimento de aguardentes: Processo de envelhecimento - Extracções dos constituintes e implicações organolépticas. *Instituto Nacional de Investigação Agrária e Pescas, Estação Vitivinícola Nacional*. Dois Portos.



Canas, S., Caldeira I., 2006b. Novas aquisições nas tecnologias de envelhecimento de aguardentes: Da árvore à vasilha. *Instituto Nacional de Investigação Agrária e Pescas, Estação Vitivinícola Nacional*. Dois Portos.

Canas S., Caldeira I., Mateus A. M., Belchior A. P., Spranger M. I., Sousa B., 2004b. Evaluation of wine brandies authenticity by the relationships between benzoic acid and cinnamic aldehydes and between furanic aldehydes. *Ciência Técnica Vitivinícola*, 19 (1), 13-27.

Canas S., Caldeira I., Leandro M. C. Spranger M. I., Clímaco M. C., Belchior A. P., 1998. Phenolic compounds in a Lourinhã brandy extracted from a different woods. *In Polyphenols Communications*, 98 (2), 373-374.

Canas S., Quaresma H., Belchior A. P., Clímaco M. C., Sousa B., 2006. Effect of natural seasoning on the chemical composition of chestnut wood used for barrel making. *Ciência Técnica Vitivinícola*, 21 (1), 1-16.

Canas S., Leandro M. C., Spranger M. I., Belchior A. P., 1999. Low molecular weight organic compounds of chestnut wood (*castanea sativa* L.) and corresponding age brandies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 5023-5030.

Cantagrel R., Mazerroles G., Vidal J. P., Galy B., Boulesteix J. M., Lablanquie O., Gaschet J., 1992a. Evolution analytique et organoleptique des eaux-de-vie de cognac au cours du vieillissement. Incidence des techniques de tonnelleres. *In Élaboration et connaissance des spiritueux*, 567-572. Cantagrel R. (ed.), Lavoisier-TEC & DOC, Paris.

Cantagrel R., Mazerroles G., Vidal J. P., Galy B., Boulesteix J. M., Lablanquie O., Gaschet J., 1992b. Evolution analytique et organoleptique des eaux-de-vie de cognac au cours du vieillissement. Incidence de la temperature et de l'hygrometrie des lieux de stockage. *I: Élaboration et connaissance des spiritueux*, 573-576. Cantagrel R. (ed.), Lavoisier-TEC & DOC, Cognac.

Cantagrel R., Mazerroles G., Vidal J. P., Galy B., Boulesteix J. M., Lablanquie O., Gaschet J., 1992c. Evolution analytique et organoleptique des eaux-de-vie de cognac au cours du vieillissement. Potentiel d'extraction vis-à-vis des composés du bois en fonction de la richesse alcoolique. In *Élaboration et connaissance des spiritueux*, 577-582. Cantagrel R. (ed.), Lavoisier-TEC & DOC, Cognac.

Carvalho A., 1989. Identificação anatómica e caracterização física e mecânica das madeiras das quartolas para produção de aguardentes velhas de qualidade – “Denominação Lourinhã” *Ciência Técnica Vitivinícola*, 13 (1-2), 71-105.

Casanova V., 2007. Actividade antioxidante de aguardentes Lourinhã. Influência das características da vasilha de madeira e do tempo de envelhecimento. Estágio de fim de curso, da Licenciatura de Engenharia Agronómica, do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa.

Chatonnet P., 1995. Le séchage et la maturation des bois en tonnellerie. *Revue Française d'Oenologie*, 151, 33-38.

Cocciardi R., Ismail A., Sedman J., 2005. Investigation of the Potential Utility of Single-Bounce Attenuated Total Reflectance Fourier Transform Infrared Spectroscopy in the Analysis of Distilled Liquors and Wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 2803-2809.

Coates J., 2002. Interpretation of infrared spectra, a practical approach. *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, R.A. Meyers (ed.), John Wiley & Sons Ltd, Chichester, 2000.

Coelho E., Barros A., Gonçalves F., Cardoso A., Rocha S., Delgadillo I., Coimbra M., 2003. Quantificação da manose polimérica em vinhos por espectroscopia de FTIR e análise multivariada. In *6º Encontro da Química de Alimentos*, Lisboa.

Conner J., Paterson A., Piggott J., 1994. Interactions between ethyl esters and aroma compounds in the model spirit solutions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42, 2231-2234.

Conner J., Paterson A., Birkmyre L., Piggott J., 1999a. Role of organic acids in maturation of distilled spirit in oak casks. *Journal of the Institute of Brewing*, 105 (5), 287-291.

Conner J., Paterson A., Birkmyre L., Piggott J., 1999b. Release of distillate flavour compounds in scotch malt. *Journal of Science and Food Agriculture*, 79, 1015-1020.

Costa R., Santos S., Almeida L., Nascimento E., Pontes M., Lima R., Simões S., Araújo M., 2004. A novel strategy to verification of adulteration in alcoholic beverages based on Schlieren effect measurements and chemometric techniques. *Microchemical Journal*, 78, 27-33.

Decreto-Lei n.º 212/2004, do Conselho de 23 de Agosto de 2004. *Estatuto da Região Demarcada das Aguardentes Vínicas da Lourinhã e dos vinhos verdes*.

Decreto-Lei n.º 300/99 de 5 de Agosto de 1999. Estabelece o regime fiscal relativo ao imposto sobre o álcool etílico e as bebidas alcoólicas (IABA) procedendo à fusão dos Decretos-Leis n.º 117/92, de 22 de Junho e 104/93, de 5 de Abril.

Deibner L., Jouret C., Puech J.-L., 1976. Substances phénoliques des eaux-de-vie d'Armagnac. I. La lignin d'extraction et les produits de sa dégradation. *Industries Alimentaires et Agricoles*, 401-414.

Delgado T., Gómez-Cordovés C., 1987. Teneur des brandies commerciaux espagnols en aldéhydes et en acides phénoliques. *Revue Française d'Oenologie*, 197, 39-43.

Delgado T., Gómez-Cordovés C., Villarroya B., 1990. Relationships between phenolic compounds of low molecular weight as indicators of the aging conditions and quality of brandies. *American Journal of Enology and Viticulture*, 41, 342-345.

Diploma n.º 41/2005, do Conselho de 26 de Abril de 2005. *Estatuto da Região Demarcada das Aguardentes do Douro (Moscatel do Douro) e Porto*.

Diploma n.º 19098/1989 do Conselho de 19 de Novembro de 1982. *Estabelece os*

---

*métodos analíticos autorizados para vinhos e seus derivados.*

Downey G., McIntyre P., Davies A., 2003. Geographic classification of extra virgin olive from the eastern mediterranean by chemometric analysis of visible and near-infrared spectroscopic data. *Society for Applied Spectroscopy*, 57, 2.

Downing D., Clark J., 1999. Estatística aplicada, 1.<sup>a</sup> edição. Editora Saraiva, São Paulo.

Duarte I., Barros A., Delgadillo I., Almeida C., Gil A., 2002. Application of FTIR spectroscopy for the quantification of sugars in mango juice as a function of ripening. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 3104-3111.

Duarte I., Barros A., Almeida C., Spraul M., Gil A., 2004. Multivariate analysis of NMR and FTIR as a potential tool for the quality control of beer. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 1031-1038.

Dubernet M., Dubernet M., 2000. Utilisation de l'analyse infrarouge à transformée de Fourier pour l'analyse oenologique de routine. *Revue Française d'Oenologie*, 181, 10-13.

Esteban-Diez, I., Gonzalez-Saiz, J. M., Pizarro, C., 2004. An evaluation of orthogonal signal correction methods for the characterisation of arabica and robusta coffee varieties by NIRS. *Analytica Chimica Acta*, 514 (1), 57-67.

Fan W., Xu Y., Yu A., 2006. Influence of oak chips geographical origin, toasted level, dosage and aging time on volatile compounds of apple cider. *The Institute of Brewing and Distilling*, 1023-457.

Ferreira M., Antunes A., Melgo M., Volpe P., 1999. Quimiometria I-Calibração Multivariada, um tutorial. *Química Nova*, 22, 5.

Gallignani M., Brunetto M., 2004. Infrared detection in flow analysis – developments and trends (review). *Talanta*, 64, 1127-1146.

- Gómez-Cordovés C., Bartolomé B., Jimeno M., 1997. Identification of 2,3-dihydroxy-1-guaiacylpropan-1-one in brandies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 1-873-876.
- Gómes-Plaza E., Gil-Munôz R., López-Roca J. M., Martínez A., 1999. Color and phenolic compounds of a young red wine as discriminating variables of its ageing status. *Food Research International*, 32, 503-507.
- Granados J., Mir M., García-Serrana H., Martínez M., 1996a. Influence of aging factors on the furanic aldehyde contents of matured brandies: aging markers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 1378-1381.
- Granados J., Mir M., García-Serrana H., Martínez M., 1996b. The influence of added caramel on furanic aldehyde content of matured brandies. *Food Chemistry*, 4, 415-419.
- Guichard E., Fournier N., Masson G., Puech J.-L., 1995. Stereoisomers of  $\beta$ -methyl- $\gamma$ -octalactone. I. Quantification in brandies as a function of wood origin and treatment of the barrels. *American Journal of Enology and Viticulture*, 46 (4), 419-423.
- Guymon J. F., 1970. Composition of California commercial brandy distillates. *American Journal of Enology and Viticulture*, 21, 61-69.
- Guymon J. F., Crowell E. A., 1972. GC-separated brandy components derived from French and American oaks. *American Journal of Enology and Viticulture*, 23, 114-120.
- Harrison B., Ellis J., Broadhursts D., Reid K., Goodacre R., Priest F., 2006. Differentiation of peats used in the preparation of malt for scotch whisky production using fourier transform infrared spectroscopy. *The Institute of Brewing & Distilling*, 112 (4), 333-339.
- Haslam E., Lilley T. H., Cai Y., Martin R., Magnolato D., 1989. Traditional herbal medicines the role of polyphenols. *Planta Medica*, 55, 1-8.

He Y., Li X., Deng X., 2007. Discrimination of varieties of tea using near infrared spectroscopy by principal component analysis and BP model. *Journal of Food Engineering*, 79 (4), 1238-1242.

Helfer, G., Ferrão M., Ferreira C., Hermes N., 2006. Aplicação de métodos de análise multivariada no controle qualitativo de essências alimentícias empregando espectroscopia no infravermelho médio. *Ciência Tecnologia de Alimento.*, 26 (4), 779-786.

Hitos P., Pons A., Hinojosa M., Lombardero J., Camacho S., Dapena P., 1995. Étude sur la caractérisation analytique du brandy de Jerey. *Bulletin de l'Organisation Internationale de la vigne et du vin*, 775-776, 746-776.

Joseph E., Marché M., 1972. Contribution à l'étude du vieillissement du Cognac. Identification de la scopolétine, de l'aesculétine, de l'ombelliférone, de la  $\beta$ -méthyl-ombelliférone, de l'aesculine et de la scopoline, hétérosides provenat du bois. *Connaissance de la vigne et du Vin*, 6, 1-58.

Jordão A., 2005. Interação entre os compostos fenólicos do vinho tinto e os compostos extraídos da madeira durante o envelhecimento. *Tese de Doutorado. Universidade de Lisboa*.

Jouret C., Puech J.-L., 1975. Importance de la lignine dans de vieillissement des rhums. *Annales de Technologie. Agricole*, 24, 325-333.

Konzen P. H. A., Furtado J. C., Carvalho C. W., Ferrão M. F., Molz R. F., Bassani I. A., Hüning S. L., 2003. Otimização de métodos de controle de qualidade de fármacos usando algoritmo genético e busca tabu. *Pesquisa Operacional*, 23 (1), 189-207.

Lachenmeier D., Richling E., López M., Frank W. e Schreier P., 2005. Multivariate analysis of FTIR and ion chromatographic data for the quality control of tequila. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 2151-2157.

Lachenmeier D., 2005. Rapid screening for ethyl carbamate in stone-fruit spirits using

FTIR spectroscopy and chemometrics. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 382, 1407-1412.

Lachenmeier D., 2007. Rapid quality control of spirit drinks and beer using multivariate data analysis of Fourier transform infrared spectra. *Food Chemistry*, 101, 825-832.

Lafon J., Couillaud P., Gaybellile F., 1973. Le cognac. Éditions J. B. Baillière, Paris.

Leão A., Souza L., Araújo A., 2007. Gerenciamento de cores – Ferramenta Fundamental para a documentação digital de bens culturais. *Revista Brasileira de Arqueometria, Restauração e Conservação*, 1 (4), 215-220.

Léauté R., Mosedale J. R., Mourugues J., Puech J.-L., 1998. Barrique et vieillissement des eaux-de-vie. In: *Oenologie fondements scientifiques et technologiques*. 1085-1142. Flanzy C. (ed.), Collection Science & Technology Agriculture, New York.

Lehtonen M., Jounela-Eriksson P., 1983. Chapter 4: Volatile and non-volatile compounds in the flavour of alcoholic beverages. Extraits de flavour of distilled beverages. *Origin and development*, edited by J. R. Piggott.

Liu L., Cozzolino D., Cynkar W. U. Gishen M., Colby C. B., 2006. Geographic classification of Spanish and Australian Tempranillo red wines by a visible and near infrared spectroscopy combined with multivariate analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 6754-6759.

Nabeta K., Yonekubo J., Miyake M., 1987. Phenolic compounds from the heartwood of European oak (*Quercus robur* L.) and brandy. *Mokuzai Gakkaishi*, 33, 408-415.

Nagarajan B., Gupta A., Mehrotra R., Bajaj M.M., 2006. Quantitative analysis of alcohol, sugar, tartaric acid in alcoholic beverages using attenuated total reflectance spectroscopy. *Journal of Automated Methods and Management in Chemistry*, 2006, 1-5.

Nagato L., Duran M., Caruso M., Barsotti R., Badolato E., 2001, Monitoramento da autenticidade de amostras de bebidas alcoólicas enviadas ao instituto Adolfo Lutz em

---

São Paulo. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 21: 39-42.

Nieuwoudt H., Prior B., Pretorius I., Manley M., Bauer F., 2004. Principal component analysis applied to Fourier Transform Infrared Spectroscopy for the design of calibration sets for glycerol prediction models in wine and for the detection and classification of outlier samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 3726-3735.

Nishimura K., Ohnishi M., Masuda M., Koga K., Matsuyama R., 1983. Reactions of wood components during maturation. In: Flavour of distilled beverages: origin and development. 241-255. Piggott J. R. (ed.), Ellis Horwood Limited, England.

Nykänen L., Suomalainen H., 1983. Evaluation of flavour *In: Aroma of beer, wiwn and distilled alcoholic beverages* 1-3. Nykänen L., Suomalainen H. (eds.), D. Reidel Publishing Company, Dordrecht, Holland.

Martens H., Naes T., 1991. Multivariate Calibration, John Wiley, New York.

Massart D. L., Vandeginste B. G. M., Deming S. N., Michotte Y. L. Kaufman L., 1988. Chemometrics: a textbook. *Elsevier*, Amsterdam.

Mangas J., Rodríguez R., Moreno J., Suárez B., Blanco D., 1996. Evolution of aromatic and furanic congeners in the maturation of cider brandy: a contribution to its characterization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 3303-3307.

Marché M., Joseph E., Goizet A., Audebert J., 1975. Étude théorique sur le cognac et son vieillissement en fût de chêne. *Reveu Française d'Oenologie*, 57, 1-17.

Masuda M., Nishimura K., 1971. Minor constituents of whisky fusel oils. 1. Basic, phenolic and lactonic compounds. *Journal of Food Science*, 36, 819-822.

Masuda M., Nishimura K., 1980. Occurrence and formation of damascenone, *trans*-2,6,6-trimethyl-1-crotonyl-ciclohexa-1,3-diene, in alcoholic beverages. *Journal of Food Science*, 45, 396-397.



- Masson E., Baumes R., Guernevé C., Puech J.-L., 2000. Identification of a precursor of  $\beta$ -methyl- $\gamma$ -octalactone in the wood of sessile oak (*Quercus petraea* (Matt.) Liebl.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 4306-4309.
- Masson E., Puech J.-L., Moutounet M., 1996. Composition chimique du bois de chêne de tonnellerie. *Bulletin de l'Organisation Internationale de la vigne et du vin*, 785, 635-657.
- Moreira J., Marcos A., Barros P., 2002. Proficiency test on FTIR wine analysis. *Ciência Técnica Vitivinícola*, 17 (2), 41-51.
- Moreira J., Santos L., 2004. Spectroscopic Interferences in fourier-transform infrared wine analysis. *Analytica Chimica Acta*, 513, 263-268.
- Moreira J., Santos L., 2005. Analysis of organics acids in wines by fourier-transform infrared spectroscopy. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 382, 421-425.
- Morgano M., Faria C., Ferrão M., Ferreira M., 2007. Determinação de açúcar total em café cru por espectroscopia no infravermelho próximo e regressão parcial em mínimos quadrados. *Química Nova*, 30 (2), 346-350.
- Office International de la Vigne et du Vin, 1994. Recueil des méthodes internationales d'analyse des boissons spiritueuses, des alcools et de la fraction aromatiques des boissons. 85-90, 224-239. OIV, Paris.
- Onishi M., Guymon J. F. Crowell E. A., 1977. Changes in some volatile constituents of brandy during aging. *American Journal of Enology and Viticulture*, 28, 152-158.
- Orriols I., 2004. ALABE: O laboratório de enologia na empresa “control de Aguardentes.
- Otsuka K., Sato K., Kawamatsu M., 1980a. Purification and properties of a precursor of  $\beta$ -methyl- $\gamma$ -octalactone, an aging flavour compound of a distilled liquors. *Hakkokogaku*, 58, 369-375.

- Otsuka K., Sato K., Yamashita M., 1980b. Structure of a precursor of  $\beta$ -methyl- $\gamma$ -octalactone, an aging flavour compound of a distilled liquors. *Journal of Fermentation Thechnology*, 58, 395-398.
- Otsuka K., Zenibayashi Y., Itooh M., Totsuka A., 1974. Presence and significance of two diastereomers of  $\beta$ -methyl- $\gamma$ -octalactone in aged distilled liquors. *Agricultural Biology and Chemistry*, 38, 485-490.
- Palma M., Barroso C.G., 2002. Application of FT-IR spectroscopy to the characterisation and classification of wines, brandies and others distilled drinks. *Talanta*, 58, 265-271.
- Panosyan A.G., Mamikonyan G.V., Torosyan M.; Gabrielyan E.S.; Mkhitarian S.A., Tirakyan M.R., Ovanesyan A., 2001. Determination of the composition of volatiles in cognac (brandy) by headspace gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Analytical Chemistry*, 56 (10), 945-952.
- Patrício I., Canas S., Belchior A.P., 2005. Effect of brandies agitation on the kinetics of extraction/oxidation and diffusion of wood extractable compounds in experimental model. *Ciência Técnica Vitivinícola*, 20 (1), 1-15.
- Patz C.-D. Blieke A., Ristow R., Dietrich H., 2004. Application of FT-MIR spectrometry in wine analysis. *Analytica Chimica Acta*, 513, 81-89.
- Pasquini C., 2003. Near infrared spectroscopy: fundamentals, practical aspects and analytical application. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 14 (2), 198-219.
- Picque D., Lieben P., Corrieu G., Cantagrel R., Lablanquie O., Snakkers G., 2006. Discrimination of cognacs and other distilled drinks by mid-infrared spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 5220-5226.

- Piggott J., Conner J., Clyne J., Paterson A., 1992. The influence of non-volatile constituents on the extraction of ethyl esters from brandies. *Journal of Science and Food Agriculture*, 59, 447-482.
- Piggott J., Conner J., Paterson A., Clyne J., 1993. Effects on scotch whisky composition and flavour of maturation in oaks casks with varying histories. *International Journal of Food Science and Technology*, 28, 303-318.
- Piggott J., Hunter E. A., Margomenou L., 2000. Comparasion of methods of analysis of time-intensity data: application to Scotch malt whisky. *Food Chemistry*, 71, 341-348.
- Pons I., Garrault C., Jaubert J.-N., Morel J., Fenyo J.-C., 1991. Analysis of aromatic caramel. *Food Chemistry*, 39, 311-320.
- Pontes M. J.C., Santos S. R. B., Araújo M. C. U., Almeida L. F., Lima R. A. C., Gaião E. N., Souto U. T. C. P., 2006. Classification of distilled alcoholic beverages and verification of adulteration by a near infrared spectrometry. *Food Research International*, 39, 182-189.
- Prida A., Ducouso A., Petit R., Nepveu G., Puech J.-L., 2007. Variation in wood volatile compounds and spatial differentiation in whisky-lactone content. *Annals of Forest Science*, 64, 313-320.
- Prida A., Puech J.-L., 2006. Influence of geographical origin and botanical species on the content of extractives in American, French, and East European Oak woods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 8115-8126.
- Puech J.-L., 1990. Delignification of oak wood with an ethanol-water solution in a flow through reactor. *Holforschung*, 44, 367-371.
- Puech J.-L., 1987. Extraction of phenolics compounds form oak wood in model solutions and evolution of aromatic aldehydes in wines aged in oak barrels. *American Journal of Enology and Viticulture*, 38, 236-238.

Puech J.-L., Jouret C., Goffinet B., 1985. Évaluation des composés phénoliques du bois de chêne au cours du vieillissement de l'armagnac. *Sciences des Aliments*, 5, 379-391.

Puech J.-L., Leauté R., Clot G., Nondedeu L., 1984. Évolution de divers constituants volatils et phénoliques des eaux de vie de cognac au cours de leur vieillissement. *Sciences des Aliments*, 4, 65-80.

Puech J.-L., Lepoutre J.-P., Baumes R., Bayonove C., Moutounet M., 1992. Influence du thermotraitement des barriques sur l'évolution de quelques composants issus du bois de chêne dans les eaux-de-vie. In: *Elaboration et connaissance des spiritueux*, 583-588. Cantagrel R. (ed.), TEC & DOC-Lavoisier e BNIC, Cognac.

Puech J.-L., Moutounet M., 1988. Liquid chromatographic determination of a scopoletin in hydroalcoholic extract of a oak wood and in matured distilled alcoholic beverages. *Journal Association of Official Analytical Chemistry*, 71, 512-514.

Puech J.-L., Moutounet M., Lepoutre J.-P., Baunes R., Bayonove C., 1994. Composés de bois de chêne extrait par les eaux de vie. *Revue des Oenologues*, 4, 27-31.

Rabier Ph., Moutounet M., 1991. Evolution d'extractibles de bois de chêne une eau-de-vie de vin. Incidence du thermotraitement des barriques. In: *Les eaux-de-vie traditionnelles d'origine viticole*, 220-230, Bertrand, A. (ed), Lavoisier-TEC & DOC, Paris.

Reazin G. H., 1981. Chemical mechanisms of whiskey maturation. *American Journal of Enology and Viticulture*, 32, 282-289.

Regulamento (CE) n.º 2870/2000 da Comissão de 19 de Dezembro de 2002. Jornal Oficial das Comunidades Europeias. *Estabelece métodos de análise comunitários de referência aplicáveis no sector das bebidas espirituosas.*

Regulamento CEE n.º 1576/1989 do Conselho de 29 de Maio de 1989. *Estabelece as regras gerais relativas à definição, à designação e à apresentação das bebidas espirituosas.*

Ribéreau-Gayon P., 1970. Le dosage les composés phénoliques totaux dans les vins rouges. *Chimie Analysis*, 52, 627-631.

Ribéreau-Gayon, J.; Paynaud, E.; Sudrad, P., Ribéreau-Gayon, P. 1982, Analyse et contrôle des vins-Tome 1. *Sciences et techniques du Vin*, p 645 Dunod, Paris.

Rizzon, L. A. R.; Zanuz, M. C. e Miele, A., 1997. Efeito da fermentação maloláctica na composição do vinho. *Ciência Rural*, 27 (3), 497-500.

Rodriguez-Sanoa L., Fry F., McLaughlin M., Calvey E., 2006. Rapid analysis of sugars in fruit juices by FT-NIR spectroscopy. *Carbohydrate Research*, 336, 63–74.

Rousseau J., Samirant M., Granes D., 2002. Evaluation du fonctionnement d'un interféromètre à transformée de Fourier (IRTF) pendant des vendanges 2001. *Revue Française d'Oenologie*, 195, 12-19.

Roux M., 1971. Les arômes des vins et des eaux-de-vie. Leurs formation et leur évolution. *Bulletin de l'Organisation Internationale de la vigne et du vin*, 484, 541-548.

Ruoff K., Luginbühl W., Künzli R., Iglesias M., Bogdanov S., Bosset J., Von Der Ohe K., Von Der Ohe W., Amado R., 2006. Authentication of the botanical and geographical origin of honey by mid-infrared spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 6873-6880.

Saiz-Abajo, M. J.; Gonzalez-Saiz, J. M.; Pizarro, C., 2004a. Classification of wine and alcohol vinegar samples based on near-infrared spectroscopy. Feasibility study on the detection of adulterated vinegar samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52 (25), 7711-7719.

Saiz-Abajo, M. J.; Gonzalez-Saiz, J. M.; Pizarro, C., 2004b. Near infrared spectroscopy and pattern recognition methods applied to the classification of vinegar according to raw material and elaboration process. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, 12 (4), 207-219.

Sarni F., Moutounet M., Puech J.-L., Rabier Ph., 1990a. Effect of the heat treatment of oak extractable compounds. *Holzforschung*, 44, 461-466.

Sarni F., Rabier Ph., Moutounet M., 1990b. Fabrication des barriques et thermotraitement: relevé des températures. *Revue Française d'Oenologie*, 123, 53-58.

Scarminio I. S., 1998. Calibração multivariada para sistemas com bandas sobrepostas através da análise de fatores do tipo Q. *Química Nova*, 21 (5), 590-596.

Schindler R., Vonach R., Lendl B., Kellner R., 1998. A rapid automated method for wine analysis based upon sequential injection (SI) - FTIR spectrometry. *Journal of Analytical Chemistry*, 362, 130-1326.

Shenk J. S., Westerhaus M. O., 1996. Calibration the ISI way. In Near Infrared Spectroscopy: The Future Waves, Davis A. M. C. and P. C. Williams. (eds.). NIR Publications, Chichester, United Kingdom.

Silva V., 2006. Validação do método cromatográfico (HPLC) para análise de ésteres fenólicos e de fenilcetonas em aguardentes envelhecidas. Estágio de fim de curso, da Licenciatura em Tecnologia e Segurança Alimentar, da Universidade Nova de Lisboa.

Silverstein R., Webster F., 1998. Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos. 6.<sup>a</sup> Edição. Livros Técnicos e Científicos Editora. Brazil. Rio de Janeiro.

Singleton V. L., Rossi J. A., 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16, 144-158.

Skoog D., Holler F., Nieman A., 2002. Princípios de Análise Instrumental. 5.<sup>a</sup> Ed. Bookman.

Skoog D., West D., Holler F., 1999. Fundamentals of Analytical Chemistry, Seventh Edition. *Saunders College Publishing*, Estados Unidos de América. Philadelphia.

Smedt P., Liddle P., 1978, Identification of 1-1diethoxypropan-2-one in spirits aged in wood. *American Journal of Enology and Viticulture*, 29 (4), 286-288.

- Snackers G., Nepveu G., Guilley E., Cantagrel R., 2000. Variabilités géographique, sylvicole et individuelle de la teneur des chênes sessiles français (*Quercus petraea* Liebl.): polyphénols, octalactones et phénols volatils. *Annals of Forest Science*, 57, 251-260.
- Spillman P.J., Pollnitz A.P., Liacopoulos D., Skouroumounis G., Sefton M.A., 1997. Accumulation of vanillin during barrel-aging of white, red and model wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 2584-2589.
- Souza J. S., Ferrão M. F., 2006. Aplicações da espectroscopia de infravermelho no controlo da qualidade de medicamentos contendo diclofeno de potássio, Parte I: Dosagem por regressão multivariada. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 42, 3.
- Souza, K.V., Peralta-Zamora, P., 2001. Spectrophotometry determination of phenol in the presence of congeners by multivariate calibration. *Anais Academia Brasileira de Ciências*, 73 (4), 519-524.
- Swierenga H., 1999. Strategy for constructing robust multivariate calibration models. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 49, 1-17.
- Subramanian A., Harper J., Sanoa-Rodriguez L., 2004. Rapid method for quantification of cheddar cheese based on flavor quality using infrared spectroscopy. *O.S.U. Food Science & Technology*. Department of Food Science and Technology, the Ohio State University, Columbus, OH 43210.
- Uddin M., Okazaki E., Turza S., Yumiko Y., Tanaka M., Fukuda Y., 2005. Non-destructive Visible/NIR Spectroscopy for Differentiation of Fresh and Frozen-thawed Fish. *Journal of Food Science*, 70 (8), 506-510.
- Vlassov V. N., Maruzhenkov D. S., 1999. Application of GC/MS method for the identification of brandies and cognacs. *Analisis*, 27, 663-667.
- Vidal J. P., Mazerolles G., Estreguil S., Cantagrel R., 1992. Analyse quantitative de la

---

fraction carbonylé volatiles des eaux-de-vie de Cognac. In: *Élaboration et connaissance des spiritueux*, 529-537. Cantagrel R. (ed.), TEC & DOC-Lavoisier, Paris.

Viriot C., Scalbert A., Lapierre C., Moutounet M., 1993. Ellagitannins and lignins in aging of spirits in oak barrels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41, 1872-1879.

Veraverbeke E., Lammertyn J., Nicolai B. M., Irudayaraj J., 2005. Spectroscopic evaluation of the surface quality of apple. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 1046-1051.

Waterhouse A., Towey J., 1994. Oak lactone isomer ratio distinguishes between wines fermented in American and French oak barrels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42, 1971-1974.

Watts V., Butzke C., Bolton R., 2003a. Study of age cognac using solid-phase microextraction and partial least-squares regression. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 83, 1143-1149.

Watts V., Butzke C., 2003b. Analysis of microvolatiles in brandy: relationship between methylketone concentration and cognac age. *Journal of Science and Food Agriculture*, 51, 7738-7742.

WineScan FT120 Type 77110 and 77310 Reference Manual, Issue 4 GB Foss Electric, Denmark, 2001. [Http://www.foss.dk](http://www.foss.dk). (01/11/07).

Wold S., Sjostrom M., Eriksson L., 2001. PLS-regression: a basic tool of chemometrics. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 58, 109-130.

Santos R., Galvão R., Araujo M., Silva E., 2007. Improvement of predication ability of PLS models employing the wavelet packet transform: A case study concerning FT-IR determination of gasoline parameters. *Talanta*, 71, 1136-1143.

Yang H., Irudayaraj J., Paradkar M., 2005. Discriminant analysis of edible oils and fats



by FT-IR, FT-NIR and FT-Raman spectroscopic. *Food Chemistry*, 93, 25-32.

Yu H., Zhou Y., Fu X., Xie L., Ying Y., 2006. Discrimination between Chinese rice wine of different geographical origins by NIRS and AAS. *European Food Research and Technology*, 225 (3-4), 313-320.



## A – Anexo

**Regulamentação Vitivinícola**Tabela 1-A-Regulamentação Vitivinícola para Aguardentes (Adaptado de [www.ivv.min-agricultura.pt](http://www.ivv.min-agricultura.pt)).

| Regulamentação Vitivinícola | Tema   | N.º Diploma/Data                             | Sumário  |
|-----------------------------|--|--|--|
|                             | Denominação de origem  | Decreto-Lei n.º 212/2004, de 23/08/2004      | Estatuto da Região Demarcada das Aguardentes Vínicas da Lourinhã e dos vinhos verdes.  |
|                             | Denominação de origem  | Diploma n.º 41/2005, de 26/04/2005           | Estatuto da Região Demarcada das Aguardentes do Douro (Moscatel do Douro) e Porto.   |
|                             | Determinações analíticas   | Regulamento n.º 2091/2002, de 26/11/ 2002    | Estabelece métodos de análise comunitários de referência aplicáveis no sector das bebidas espirituosas.  |
|                             | Determinações analíticas   | Diploma n.º 19098/98, de 19/11/1998          | Métodos de análise para a determinação das características analíticas das bebidas espirituosas.  |
|                             | Determinações analíticas   | Regulamento 2870/2000, de 19/12/2000         | Métodos de análise comunitários de referência aplicáveis no sector das bebidas espirituosas.   |
|                             | Determinações analíticas   | Diploma n.º 985/82, de 19/10/1982            | Estabelece os métodos analíticos autorizados para vinhos e seus derivados.   |
|                             | Determinações analíticas   | Decreto-Lei n.º 147/98, de 23/05/98          | Disposições administrativas relativas à competência para a identificação dos métodos de análise para verificação das características analíticas legalmente fixadas para as bebidas espirituosas e os álcoois de origem vitivinícola. |
|                             | Regras gerais aplicadas às bebidas espirituosas                        | Regulamento n.º 110/2000, de 15/01/2008      | Estabelece as regras gerais relativas à definição, à designação e à apresentação das bebidas espirituosas.   |
|                             | Normas de aplicação às regras gerais aplicadas às bebidas espirituosas | Regulamento (CEE) n.º 1014/90, de 24/04/1990 | Estabelece as normas de aplicação para a definição, designação e apresentação das bebidas espirituosas.  |
|                             | Práticas enológicas  | Diploma n.º 1622/2000, de 24/07/2000         | Estabelece determinadas normas de execução do Regulamento (CE) n.º1493/1999 - e constitui um código comunitário das práticas e tratamentos enológicos.   |

|  |  |                                       |  |
|--|--|---------------------------------------|--|
|  | Impostos   | Decreto-Lei n.º 566/99, de 22/12/1999 | Estabelece o regime fiscal relativo ao imposto sobre o álcool etílico e as bebidas alcoólicas (IABA), procedendo à fusão dos Decretos-Leis n.ºs. 117/92, de 22 de Junho e 104/93, de 5 de Abril. |
|  | Preparação   | Portaria n.º 283/85, de 13/05/85      | Regras a observar pelas destilarias e estabelecimentos que pretendam preparar bebidas espirituosas.  |
|  | Rotulagem  | Decreto-Lei n.º 376/97, de 24/12/97   | Estabelece as normas legais e as regras técnicas a observar na rotulagem do vinho e das bebidas do sector vitivinícola.  |
|  | Definições das várias bebidas espirituosas de origem vínica. | Decreto-Lei nº 390/86 de 21/11/1986   | Estabelece as definições das várias bebidas espirituosas de origem vínica.   |

### *Parâmetros Analíticos*

Tabela 2-A-Limites analíticos e limites de emprego de bebidas espirituosas (Adaptado de [www.ivv.min-agricultura.pt](http://www.ivv.min-agricultura.pt)).

| Os valores apresentados na tabela seguinte aplicam-se a bebidas espirituosas                     |   |  |
|--|---|--|
| Parâmetros   | Limite  | Base Jurídica  |
| <b>Metanol</b><br>Aguardentes Vínicas<br>Aguardentes<br>Bagaceiras<br>Brandy                     | $\leq 200$ g/hL de Alc. Abs.<br>$\leq 1000$ g/hL de Alc. Abs.<br>$\leq 200$ g/hL de Alc. Abs. | REG (CEE) N.º 1576/89 Art.º 1-4 d)<br>REG (CEE) N.º 1576/89 Art.º 1-4 f)<br>REG (CEE) N.º 1576/89 Art.º 1-4 e) |
| <b>Teor de Substâncias Voláteis</b><br>Aguardente Vínicas<br>Aguardentes<br>Bagaceiras<br>Brandy | $\geq 125$ g/hL de Alc. Abs.<br>$\geq 140$ g/hL de Alc. Abs.<br>$\geq 125$ g/hL de Alc. Abs.  | REG (CEE) N.º 1576/89 Art.º 1-4 d)<br>REG (CEE) N.º 1576/89 Art.º 1-4 f)<br>REG (CEE) N.º 1576/89 Art.º 1-4 e) |
| <b>Título Alcoométrico Volúmico</b><br>aguardente vínica<br>aguardente bagaceira<br>brandy       | $\geq 37,5$ %Alc. Vol.<br>$\geq 37,5$ %Alc. Vol.<br>$\geq 36,0$ %Alc. Vol.                    | REG (CEE) N.º 1576/89 Art.º 3-   |

***Características organolépticas e físico-químicas da aguardente vínica branca para  
certificação.***

**a) Características organolépticas**

Limpidez – límpido;

Cor – incolor;

Aroma e sabor - sem quaisquer outros estranhos à matéria-prima.

**b) Características físico-químicas:**

| Parâmetro                            | Valor limite  |
|--------------------------------------|---|
| Limpidez                             | Límpido   |
| Cor                                  | Incolor   |
| Título alcoométrico                  | $77,0 \pm 0,5$ % v/v a 20 °C  |
| Acidez total                         | $\leq 300$ mg de ácido acético/ dm <sup>3</sup> de álcool a 100 % v/v |
| Álcoois superiores                   | 210 a <b>300</b> mg/ 100 cm <sup>3</sup> de álcool a 100 % v/v        |
| Metanol                              | $\leq 100$ mg/ 100 cm <sup>3</sup> de álcool a 100 % v/v              |
| 2-Butanol                            | $\leq 4$ mg/ 100 cm <sup>3</sup> de álcool a 100 % v/v                |
| n-Butanol                            | $\leq 1,7$ mg/ 100 cm <sup>3</sup> de álcool a 100 % v/v              |
| Relação n-Propanol/iso-Butanol       | $\leq 0,8$  |
| Relação álcoois amílicos/iso-Butanol | $\geq 2,5$  |
| Álcool alílico                       | $\leq 1,5$ mg/ 100 cm <sup>3</sup> de álcool a 100 % v/v              |
| Etanal                               | $\leq 70$ mg/ 100 cm <sup>3</sup> de álcool a 100 % v/v               |
| Acetato de etilo                     | $\leq 120$ mg/ 100 cm <sup>3</sup> de álcool a 100 % v/v              |

---

|                    |   |
|--------------------|---|
| Cobre              | $\leq 1 \text{ mg/ dm}^3$ de Aguardente   |
| Ferro              | $\leq 1 \text{ mg/ dm}^3$ de Aguardente   |
| Cálcio             | $\leq 3 \text{ mg/ dm}^3$ de Aguardente   |
| Ácido cianídrico   | $\leq 0,2 \text{ mg/ dm}^3$ de Aguardente |
| Carbamato de etilo | $\leq 120 \text{ }\mu\text{g/ dm}^3$      |

Notas:

- I. O resíduo correspondente ao extracto seco total deverá ser incolor ou branco, não deverá demonstrar qualquer anormalidade relativamente ao resíduo típico obtido por evaporação da aguardente vínica branca.
- II. A proveniência vínica da aguardente será verificada pela relação  $^{13}\text{C} / ^{12}\text{C}$ , pela abundância de  $^{14}\text{C}$  e pelas Razões Isotópicas de Deutério/Hidrogénio.

**Anexo B*****Métodos comuns de análise de Aguardentes***

Os métodos analíticos apresentados, no Anexo B, são transcritos do manual “*Métodos de Análise de Aguardentes I. Análise Clássica*”, elaborado por Belchior e Carvalho (1984).

**I. Título alcoométrico volúmico**

O método de referência considerado internacionalmente é o de destilação e picnometria.

O método usual da Organização Internacional da Vinha e do Vinho (O.I.V.) e o método oficial Português é o método por destilação e avaliação do teor alcoólico por aerometria (alcoometria) (Blechior *et al.*, 1984b).

**1. Destilação****Modo operativo**

Medir para um balão de 250 mL a aguardente a destilar, determinando a temperatura. Se o teor alcoólico bruto em volume, for maior do que 60% v/v diluir a aguardente a 1/2. Introduzir a aguardente medida, num balão de aquecimento de 1000 mL. Passar o balão volumétrico quatro vezes por 5 mL de água destilada e juntar pedaços de pedra-pomes ou esferas de vidro. Adaptar o balão de aquecimento ao sistema de destilação.

Colocar o balão volumétrico, que serviu anteriormente para medição da aguardente, na recepção do destilado com cerca de 5 a 10 mL de água destilada. A extremidade da coluna de destilação deverá estar mergulhada na água destilada.

Abrir a água de refrigeração (esta deverá ter uma temperatura que permita ao destilado sair com cerca de 15°C).

No início do aquecimento diminuir a intensidade calorífica, aumentando-a a partir do meio da destilação. Destilar até um pouco menos de 250 mL.

Levar o balão volumétrico à temperatura a que foi executada a medição da aguardente ( $\pm 1^\circ\text{C}$ ) e acertar com água destilada.

## **2. Determinação do teor alcoólico em volume por alcoometria**

### **Modo operativo**

Introduzir a aguardente ou o destilado na proveta e mergulhar o alcoómetro e o termómetro. Aguardar alguns minutos (5 minutos) para uniformizar a temperatura e verificar que não existem bolhas de ar aderentes ao alcoómetro. Ler a temperatura e retirar o termómetro. Proceder à leitura do alcoómetro e anotar esse valor. Repetir a determinação três vezes.

### **Expressão dos resultados**

Nas determinações efectuadas com alcoómetros aferidos a 20° C; corrigir a temperatura pela tabela II dos métodos analíticos oficiais .

Na determinações efectuadas com alcoómetros aferidos a 15° C, corrigir a temperatura pela tabela n.º V de “Misturas Hidroalcoólicas” (Belchior *et al.*, 1984b ) e efectuar a conversão a 20° C pela tabela VI das normas portuguesas (Belchior *et al.*, 1984b).

Os resultados apresentam-se arredondados às décimas.

## **II. Acidez total**

### **Soluções**

- \* Hidróxido de sódio 0.1 N
- \* Indicador vermelho de fenol

### **Modo operativo**

Pipetar 25 mL de aguardente para um balão de erlenmeyer de 250 mL e adicionar 25 mL de água destilada. Adicionar três a quatro gotas do indicador vermelho de fenol. Titular com hidróxido de sódio 0.1 N. Anotar o volume de hidróxido de sódio 0.1 N gasto (n) (Belchior *et al.*, 1984a).

### **Expressão de resultados**



Acidez total =  $n \times 0.24$  g de ácido acético /L

Acidez total =  $\frac{n \times 24}{T}$  g de ácido acético /L a.p.

### III. Acidez Fixa

Soluções

- \* Hidróxido de sódio 0.1 N
- \* Indicador vermelho de fenol

#### Modo operatório

Adicionar 50 mL de água destilada ao extracto seco, removendo cuidadosamente até à dissolução total. Colocar o dissolvido num balão erlenmeyer de 250 mL. Adicionar três a quatro gotas do indicador de vermelho de fenol. Titular com hidróxido de sódio 0.1 N. Anotar o volume gasto de hidróxido de sódio 0.1 N.

#### Expressão de resultados

Acidez total =  $n \times 0.12$  g de ácido acético /L

Acidez total =  $\frac{n \times 12}{T}$  de ácido acético /L a.p.

### IV. Acidez Volátil

É a diferença entre a acidez total e a acidez fixa. Expressa-se em g de ácido acético por litro de aguardente.

### V. Extracto seco

#### Modo operatório

Colocar uma cápsula de platina ou quartzo numa estufa a 100° C, durante 30 minutos. Arrefecer a cápsula num excicador. Determinar a massa da cápsula numa balança de precisão e anotar esse valor (tara - T). Pipetar 50 mL de aguardente para a cápsula que se coloca em banho-maria, deixando evaporar lentamente durante três horas. Colocar a

cápsula na estufa a 100° C durante 30 minutos. Arrefecer a cápsula no excicador. Determinar a massa com a balança de precisão e anotar o valor (P).

### **Expressão de resultados**

Extracto seco = (P-T) x 20 g/L

Em que: P- corresponde a massa da cápsula depois da aguardente evaporar.

T- corresponde a massa da cápsula.

## **VI. Cor (Intensidade da cor a 440 nm)**

### **Modo operativo**

Colocar a aguardente em “cuvette” de 10 mm de percuso óptico. Determinar a absorvância a 440 nm. Se necessário efectuar diluição da aguardente com solução hidroalcoólica do mesmo teor alcoólico.

Para acerto do espectrofotómetro utilizar uma solução hidroalcoólica com o mesmo teor alcoólico que a aguardente.

### **Expressão dos resultados** - em unidades de absorvância.

No caso de se efectuarem diluições ou serem usadas “cuvettes” de outra dimensão, multiplicando o valor de absorvância pelo factor de diluição ou por 5/p, sendo que p corresponde ao percurso óptico em mm.

## **VII. Compostos fenólicos Totais**

### **Soluções**

- \* Reagente de Folin-Denis – adicionar num balão aferido de 1000 mL: 100 g de tungstato de sódio; 20 g de ácido fosfomolibdico; 50 mL de ácido fosfórico a 85%; 750 mL de água destilada. Levar à ebulição, em banho-maria, durante 2h sob refluxo. Arrefecer e completar o volume com água destilada.
- \* Solução de carbonato de sódio a 20%
- \* Solução mãe de ácido gálico 0,1 g/L

**Modo operativo**

Num balão aferido de 1000 mL de água destilada, pipetar 1 mL da amostra ou no caso da curva de calibração 1; 2; 3; 4; 5; 6; 7; 8; 9; 10 da solução mãe de ácido gálico (cada solução contém respectivamente 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,7; 0,8; 0,9; 0,10 g de ácido gálico por litro). Juntar 3 mL do reagente de Folin-Denis, agitar e passado 3 minutos, adicionar 10 mL de solução de carbonato de sódio 20%. Completar o volume a 100 mL com água destilada. Agitar, deixando ficar em repouso durante 1h. Determinar a absorvância a 760 nm, usando como referência o ensaio branco.

**Expressão dos resultados**

Leitura directa na curva de calibração expresso em g/L de ácido acético.